

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LES FACTEURS CONDITIONNANT L'HABITAT
DES MOLLUSQUES VECTEURS DES BILHARZIOSES
LEURS INCIDENCES ÉPIDÉMIOLOGIQUES
IV. — CONSTANTES PHYSIOLOGIQUES DE LA REPRODUCTION
ET PARTICULARITÉS EN FONCTION DES ESPÈCES. CONCLUSIONS

par R. DESCHIENS

(*Institut Pasteur, Service de Parasitologie*)

La ponte, la vie larvaire et la jeunesse des mollusques vecteurs, peut-être également l'accouplement, ne s'effectuent que dans des limites correspondant à un état relativement stable et constant du biotope et du climax.

On peut isoler, actuellement, dans ce complexe, quelques postes physico-chimiques et biologiques qui rentrent dans le cadre des « constantes physiologiques de la reproduction des mollusques » (Horton) étudiées par les naturalistes. L'incidence de ces faits sur l'habitat est évidente, car ces constantes ne se rencontrent que dans des niches qui sont la véritable patrie, quasi spécifique, des mollusques. Cette notion peut expliquer la répartition spécifique des vecteurs.

Ces constantes physiologiques sont, naturellement, susceptibles de varier d'une espèce vectrice à l'autre car elles tendent, par nature, vers la spécificité. Cependant, à quelques exceptions près,

(chez *Ferrissia tenuis* par exemple), elles sont assez voisines, en particulier chez les Planorbidés, pour pouvoir être considérées ensemble.

Nous ne disposons que de peu d'informations sur cette question, les postes correspondant aux caractères permanents connus sont les suivants.

La température élective, favorisant la ponte, l'éclosion et la vie des larves et des jeunes mollusques, se situe, pour *P. glabratus*, *P. adowensis*, *B. contortus*, *O. nosophora*, *O. formosana* et *O. quadrasi*, entre 24 et 26° centigrades.

Les pontes, l'incubation et la vie larvaire peuvent être obtenues à des températures inférieures à 24° et pouvant s'abaisser jusqu'à 20°, environ, mais, dans ces conditions, la durée de l'incubation et de la croissance est allongée. A des températures voisines de 30°, la ponte, l'incubation, la vie larvaire et la croissance ne sont plus régulièrement assurées.

Une concentration appropriée de l'eau en sels minéraux solubles est une condition du développement du cycle de la reproduction. Nous avons vu que cette concentration est un facteur de l'habitat chez l'adulte, c'est un facteur plus déterminant encore chez la larve et chez le jeune mollusque qui ne supportent pas, ou supportent mal, les salinités qui n'incommodent pas les adultes. Il y a, là, des constantes physiologiques de concentration saline qui ne sont qu'incomplètement étudiées ; on sait, par exemple, que les formes adultes de *P. glabratus* sont capables de vivre dans des eaux dont la concentration en ClNa est de 6 p. 1 000, alors que les jeunes larves et les très jeunes animaux, dont l'osmo-régulation est moins souple, ne supportent pas une concentration de 4 p. 1 000 de ce sel. D'autres plafonds de concentration, pour d'autres sels, sont, actuellement, étudiés.

D'autre part, il existe des seuils de concentration de l'eau en sels minéraux, en particulier pour les chlorures, les phosphates et le calcium, qui sont nécessaires à la croissance des larves et des jeunes mollusques. Ceux-ci sont incapables de se développer dans l'eau de pluie et dans l'eau distillée et l'analyse des eaux favorables à la ponte et à la croissance montre qu'une minéralisation, minima, par litre, de 100 à 300 mg de résidu sec (à 180°), avec des postes : de 7 à 8 mg de chlore, 100 mg de chaux (exprimé en CaO), 5 mg de sodium, 0,5 mg de P_2O_5 est habituelle (Deschiens, 1956).

Le pH n'intervient que d'une manière relative sur les possibilités de croissance des larves et des jeunes mollusques, cependant les limites de l'acidité ionique compatible avec la vie larvaire et celle des stades juvéniles sont plus rapprochées que pour les adultes.

Les larves et les jeunes mollusques, dont le radula n'a pas acquis une résistance suffisante pour brouter les plantes aquatiques, et dont les besoins en azote sont élevés comme chez tous les organismes en croissance, doivent trouver dans leur habitat une qualité d'aliments appropriés. Ils sont, surtout, microphages et leurs besoins alimentaires leur font rechercher les algues microscopiques, les bactéries, les protophytes et les protozoaires, petits organismes qui vivent dans les boues, les vases, les limons ou à la surface des végétaux. La pullulation de cette matière alimentaire se fait, surtout, aux saisons correspondant justement à la reproduction des mollusques. Cette concordance est un facteur biotique favorable à la reproduction que l'on peut ranger parmi les constantes physiologiques. La concordance entre la pullulation des micro-aliments et l'éclosion et la croissance des jeunes mollusques s'observe aisément dans les élevages au laboratoire. De mai à septembre, dans l'hémisphère nord, on voit apparaître, en abondance, sur les parois des aquariums, ou des bocaux d'élevage des mollusques, des algues vertes microscopiques qui en tapissent les parois ; c'est dans ces champs d'algues que les jeunes mollusques recherchent leur nourriture.

Les notions que nous possédons sur les constantes de la reproduction chez les mollusques ne sont, encore, que liminaires ; on sait, néanmoins, l'intérêt pratique de leur connaissance puisqu'elles peuvent conduire à perturber, à des fins molluscocides, le biotope et le climax qui les assurent.

Particularités de l'habitat en fonction des genres ou des espèces.

Si les facteurs abiotiques et biotiques, conditionnant l'habitat des différents vecteurs des bilharzioses, apparaissent, dans l'ensemble, comme semblables, il existe, cependant, des sensibilités et des impératifs biologiques particuliers à certains genres ou à certaines espèces, et, surtout, à leurs formes larvaires et juvéniles.

La répartition géographique, bien définie et bien tranchée, des espèces vectrices, par aires de spécificité, sur un même continent — l'Afrique, par exemple — est un *fait* dont nous ne saisissons pas toujours la cause mais dans lequel interviennent, pour partie, l'habitat et la satisfaction des besoins spécifiques des mollusques.

Notre mémoire souligne ici, l'insuffisance de nos connaissances à cet égard et la nécessité de prospections et de recherches nouvelles pour les perfectionner. Néanmoins, certaines données indicatives des particularités générées ou spécifiques de l'habitat

sont connues ; elles peuvent servir de pilotes aux expérimentateurs.

PARTICULARITÉS CONCERNANT L'HABITAT DES PLANORBINÉS.

Les Planorbes, et en particulier *P. glabratu*s et *P. adowensis*, s'adaptent plus facilement à des eaux polluées (issues ménagères, fumiers, boues, matières organiques en décomposition) que les Bulins (*B. contortu*s, *B. strigosu*s) et les Physopsis.

Cette tolérance relative pour des habitats putrides peut être contrôlée expérimentalement, *P. glabratu*s, en effet, peut s'adapter à des eaux contenant 2 p. 1 000 de sulfate d'ammonium $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, et 0,1 p. 1 000 d'ammoniaque, alors que la limite de tolérance de *B. contortu*s et de *B. strigosu*s est de 1 p. 1 000 pour le sulfate d'ammoniaque et 0,05 p. 1 000 pour l'ammoniaque.

L'adaptation des Planorbes aux eaux chlorurées est aussi meilleure que celle des Bulins ; la limite de tolérance de *P. glabratu*s et de *P. adowensis* pour ClNa est de 6 p. 1 000, alors que celle de *B. contortu*s et de *B. strigosu*s ne dépasse pas 4 p. 1 000.

D'autre part, les Planorbes s'accommodeent plus facilement que les Bulins de l'absence des phanérogames dans les gîtes et ils se contentent, souvent, de boues ou de limons nutritifs contenant des bactéries, des protophytes, des algues, des sphaignes, des protozoaires et de menus débris organiques, en particulier.

Il semble, aussi, que les eaux relativement alcalines (pH : 9,8) soient un facteur de l'habitat mieux toléré par les Planorbinés que par les Bulininés. On sait, en particulier, [Gastellier, Delmotte, Jadin (1945-1948)] que les grandes Planorbes (*P. tanganiakanus*) des lacs du Congo belge vivent dans des eaux dont le pH se situe entre 8,5 et 9,2.

PARTICULARITÉS CONCERNANT L'HABITAT DES BULININÉS.

Les Bulins et les Physopsis vivent, en général, dans des collections d'eaux moins polluées que celles des gîtes à Planorbes — ce qui n'exclut pas que les gîtes puissent être communs. Nous avons vu qu'expérimentalement les sels d'ammoniaque et l'ammoniaque dissous dans l'eau étaient plus mal supportés par les Bulins que par les Planorbes. Cependant, la tolérance des Bulins pour les nitrates naturels et, en particulier, pour NO_3Na et NO_3K s'avère meilleure que celle des Planorbes.

Les Bulininés paraissent avoir un régime phytophage plus strict que les Planorbinés et leurs gîtes correspondent, le plus souvent, à un couvert végétal relativement important. Les Bulins se rencontrent, d'ailleurs, dans les gîtes, davantage sur les végétaux

que dans les couches limoneuses du biotope et affirment ainsi leurs besoins en tissus végétaux riches en chlorophylle.

Ces constatations se relient à la nécessité d'une insolation suffisante pour que le couvert s'édifie aisément ; les gîtes à Bulins sont des gîtes habituellement assez ensoleillés et non des habitats ombragés comme ceux des Oncomélanies.

Dans l'ensemble, le pH des gîtes à Bulins est davantage orienté dans la zone acide que dans la zone alcaline.

PARTICULARITÉS DE L'HABITAT DES *Oncomelania*.

Les aptitudes de prosobranches et d'amphibiens des *Oncomelania* leur font rechercher des habitats offrant certaines particularités, bien que les facteurs généraux qui conditionnent ceux-ci s'encaillent, dans l'ensemble, avec ceux qui concernent les autres mollusques vecteurs.

On sait qu'au Japon, suivant les saisons, on trouve hors de l'eau (juin à octobre) 60 à 75 p. 100 de la population d'*O. nosophora* contre 25 à 30 p. 100 pendant la saison froide (janvier à mars [Li, 1953]). L'examen des évolutions d'une population immergée d'Oncomélanies montre que, pendant un cycle de vingt-quatre heures, 60 à 75 p. 100 des mollusques sortent de l'eau.

Le fait que les Oncomélanies utilisent le couvert végétal des terres riveraines de leur habitat aquatique implique une certaine exubérance de la végétation et un index d'humidité élevé des territoires où les mollusques trouvent leur nourriture ; ceci, à son tour, implique une insolation atténuée des gîtes.

Le développement des canaux et des fossés d'irrigation ombragés de bambous, les nombreuses haies qui divisent les territoires de culture, la densité des végétaux, le terrain humique et mouillé assurent : une insolation légère, la régulation de la température, la réduction de l'évaporation et, par conséquent, l'établissement de gîtes aériens et aquatiques favorables.

Les sols sableux ou caillouteux sont plus favorables que les vases et les boues au développement des Oncomélanies et il a été noté, expérimentalement (Ritchie, 1955, *op. cit.*), une recherche préférentielle de la brique et du ciment par ces mollusques.

La phytophagie des Oncomélanies est plus accentuée encore que celle des Bulinines, elle explique les préférences alimentaires des mollusques pour les phanérogames et pour les cultures vivrières des terrains marécageux et des rizières. Expérimentalement (Izumi, 1951 [1] ; Loma Linda, 1954 [2]), on a pu établir la recherche préférentielle par les Oncomélanies de la cellulose pure (papier filtre), de la gélose, des algues et de l'amidon, ce

qui n'exclut pas, d'ailleurs, la microphagie des protides (protozoaires, protophytes, boues alimentaires).

L'acidité du sol est un facteur favorable de l'habitat pour les Oncomélanies ; les sols acides sont, d'ailleurs, les plus nombreux au Japon. Le pH des eaux des gîtes est, généralement, situé dans la zone acide.

Chez les mollusques amphibiés que sont les Oncomélanies, le choix du lieu de ponte qui constitue une séquence de l'habitat est, lui-même, amphibia ; tantôt les œufs sont déposés sur le sol ou dans le sol, juste au-dessus du niveau de l'eau, tantôt ils sont distribués dans le sol au-dessous du niveau de l'eau (Loma Linda, 1954, *op. cit.*) ; suivant les espèces, le choix en situation immergée ou émergée du lieu de ponte subit des fluctuations ; 95 p. 100 des œufs d'*O. nosophora*, par exemple, sont pondus juste au-dessus du niveau de l'eau alors que, chez *O. quadrasi*, 66 p. 100, seulement, des œufs sont déposés dans la même situation.

PARTICULARITÉS CONCERNANT L'HABITAT DES *Ferrissia*.

On sait que *Ferrissia tenuis* (Bourguignat), petit Ancylidé du groupe des Pulmonés, mesurant, en moyenne, 2,5 mm × 1 mm, est considéré comme vecteur d'une bilharziose urinaire humaine, probablement à *S. hæmatobium*, aux Indes, dans la région suburbaine de Bombay (S. N. Shah et R. K. Gadgil, 1955 [3, 4, 5]).

Les facteurs conditionnant l'habitat de ce mollusque délicat offrent des modalités qui peuvent être individualisées par ses conditions d'élevage. *F. tenuis* vit dans des rivières dont la capacité, qui est considérable pendant la mousson (juin à octobre), se réduit à celle d'une petite rivière au cours lent avec des doigts d'eau stagnante, après la mousson (novembre à février), période pendant laquelle les *Ferrissia* vivent fixées aux pierres et aux feuilles de plantes aquatiques, ou aériennes, entraînées dans l'eau, souvent associées à un mollusque Prosobranche (*Paludomus obesa*).

Les conditions d'élevage de *F. tenuis* montrent que ce mollusque a des exigences biologiques assez strictes. L'eau doit être claire à des exigences biologiques strictes. L'eau doit être claire et très oxygénée (aération par pompage électrique : 1 à 5 l par minute), contenir 2 g de chlorure de sodium, environ, par litre, et avoir un pH acide (pH 6) ; la température de l'eau doit être maintenue entre 21° et 32° centigrades (T. élective : 26 à 30°) ; l'addition de gravier latérisé est nécessaire. La phytochagie paraît dominante (feuille de mangues macérées, laitue cuite), mais une microphagie active (protides des protozoaires et protophytes) doit être satisfaite par la présence d'une microflore et d'une microfaune appropriées.

L'étude biologique et écologique de *F. tenuis*, bien qu'incomplète encore, montre que l'on est en présence d'un vecteur fragile et délicat dont la répartition géographique semble assez limitée. La découverte récente de sa qualité de vecteur probable d'une bilharziose humaine rehausse, naturellement, l'intérêt de son étude et pose le problème de la possibilité d'adaptation d'autres Ancylidés au rôle de vecteurs des bilharzioses.

CONCLUSIONS.

L'étude des facteurs conditionnant l'habitat des mollusques vecteurs des bilharzioses conduit à des précisions et à des remarques offrant deux principaux versants.

Sur le versant biologique et écologique, il est possible de définir : 1° Les caractères généraux de l'habitat des mollusques vecteurs (facteurs abiotiques, facteurs biotiques). 2° Certaines particularités qu'offre l'habitat en fonction des différents groupes zoologiques de mollusques vecteurs. 3° Les relations de l'habitat et des possibilités d'établissement de constantes physiologiques, génériques ou spécifiques nécessaires à la reproduction.

Sur le versant épidémiologique et prophylactique, il est possible d'apprécier : 1° L'incidence de la connaissance des facteurs de l'habitat et de la biologie des mollusques vecteurs sur les méthodes molluscocides. 2° L'incidence des précisions concernant l'habitat sur la prospection des gîtes des mollusques vecteurs et des foyers de bilharziose. 3° Les risques d'adaptation de nouvelles espèces de mollusques au rôle de vecteurs des bilharzioses.

I. — Caractères généraux de l'habitat ; facteurs qui le conditionnent.

Nous distinguons dans l'habitat *sensu largo* : 1° le « biotope » qui est représenté par l'ensemble des caractères physico-chimiques du milieu, conçu comme un cadre capable de contenir des associations animales et végétales ; 2° le « climax » qui est l'ensemble des associations végétales et animales qui peuplent le milieu, et qui interviennent, d'ailleurs, sur le milieu, lui-même, en le modifiant et en assurant le cycle de la matière et l'équilibre biologique.

L'habitat des mollusques vecteurs des bilharzioses correspond, dans son ensemble, aux eaux douces, tièdes, stagnantes ou à faible courant, peu profondes, subissant une insolation ménagée et plus ou moins riches en couvert végétal aquatique, des régions chaudes et intertropicales.

A. FACTEURS ABIOTIQUES DE L'HABITAT. — Le *climat* intervient par ses facteurs thermiques et hydriques (chaleur, précipitations),

les extrêmes thermiques de grande amplitude n'ont qu'une influence seconde ; ce sont les moyennes thermiques (lignes isothermes de +20°) qui ont une incidence majeure.

Les *éco climats*, qui représentent les conditions climatiques d'un certain type de site (savane, forêt, désert, versants montagneux), n'interviennent que par leur incidence sur l'humidité, l'insolation et la rétention de l'eau.

La *température moyenne optima* de l'eau, pour l'ensemble des espèces vectrices, se situe entre 22 et 26°. La *lumière* agit, surtout, indirectement, en assurant la croissance de la flore nécessaire à l'alimentation et au cycle de la matière ; son influence sur les glandes endocrines des mollusques et sur leur équilibre biologique ne peut, cependant, être exclue.

Le *facteur orographique* a une incidence indirecte, il n'intervient que par l'abaissement des moyennes thermiques avec l'altitude.

La *radio-activité*, aux doses faibles où on les rencontre dans la nature (griffons radio-actifs), est sans influence.

Le *facteur géologique* n'intervient que dans la mesure où il n'exclut pas la possibilité d'une minéralisation de l'eau et d'un cycle assurant aux mollusques l'azote, les phosphates, les chlorures et la chaux dont ils ont besoin.

Les *travaux d'art et les aménagements humains*, en fabriquant de la richesse, surtout agricole, créent, le plus souvent, des conditions favorables d'habitat pour les mollusques (Egypte, Soudan, Japon).

La *profondeur d'eau optima* se situe entre la surface et 2 m, ce qui correspond au type de flore et de faune favorable du climax des mollusques et non à une action défavorable de la pression d'eau.

La *capacité osmo-régulatrice* médiocre des mollusques les constraint au choix d'un habitat faiblement minéralisé.

Le *pH* de l'habitat se situe entre 4 et 10 ; il existe donc une marge de tolérance.

Les besoins des mollusques en oxygène sont très réduits ; leur résistance au gaz carbonique et à l'asphyxie est considérable, à l'inverse de celle des poissons.

La *minéralisation* de l'eau est un facteur très important de l'habitat ; elle intervient : 1° comme facteur alimentaire ; 2° comme agent de la tonicité du milieu aquatique ; 3° par les propriétés toxiques éventuelles des sels dissous (baryum, ammonium).

Les téguments minces et très perméables des mollusques et leur faible capacité d'osmo-régulation les rendent très sensibles à la minéralisation. Les taux des sels minéraux tolérés par les mollusques vecteurs dans les eaux naturelles, et, expérimentalement, les caractères analytiques des eaux des gîtes sont inventoriés dans

ce mémoire. La tolérance pour le chlorure de sodium, par exemple, ne dépasse pas une concentration de 6 p. 1 000 (*P. glabratus*).

La sensibilité des mollusques vecteurs aux *substances toxiques* minérales ou organiques est considérable ; elle se montre cent fois supérieure, environ, à celle des poissons.

B. FACTEURS BIOTIQUES DE L'HABITAT. — Le rôle du facteur alimentation est majeur. Les mollusques vecteurs sont, surtout, phytophages dans le cadre d'un régime omnivore et de pratiques microphagiques répondant à leurs besoins en azote (protistes et organismes microscopiques). La présence de phanérogames (flore palustre, cultures vivrières submergées) ou d'une flore vicariante de mousses, de lichens, d'algues et, en outre, de matières organiques, en décomposition ménagée, et de petits organismes vivants (algues microscopiques diatomées, protistes, petits crustacés, ver-midiens) est nécessaire. Ceci implique la réalisation d'un habitat dans lequel la circulation et le cycle métabolique de la matière nutritive sont relativement stables et constants.

La *flore et la faune du climax*, en fonction de la nature des différents gîtes, sont inventoriées, dans ce mémoire de façon indicative. Les associations zoophytiques rencontrées dans les gîtes sont spécifiquement variables en fonction de la distribution géographique de ceux-ci, mais elles répondent à des types de flore et de faune relativement définis et constants.

Les *ennemis naturels*, les *prédateurs*, les *maladies* des mollusques vecteurs, connus, qui sont des éléments du climax, sont inventoriés dans ce mémoire : Infusoires, Crustacés (*Cypridopsis*, *Ecrevisses* du genre *Cambarus*, Crabes du genre *Potamon*), Mollusques pulmonés non vecteurs (Limnées, *Physes*), Poissons (*Spirobranchus*, *Gambusia*), Batraciens (Pleurodèles), Oiseaux aquatiques (Canards) ; maladies trophiques, maladies infectieuses, bactériennes et parasitaires.

Les *associations malacologiques* entre vecteurs et non-vecteurs, les *compétitions* et les *interactions* entre les mollusques dans le cadre de l'habitat (Limnées, Planorbes, *Physes*, *Bulins*, *Physopsis*, *Ancyles*, *Prosobranches*) sont étudiées dans ce mémoire ; il existe, dans l'ensemble, une tolérance relative réglée par le degré d'abondance de la nourriture et par la concurrence alimentaire.

En fonction des saisons, les populations de mollusques vecteurs subissent des *fluctuations* (concentrations, dispersion, rythme des pontes et des éclosions, enfouissement), en rapport, dans les régions intertropicales, avec les alternances des hivernages (saison des pluies) et des saisons sèches, et, dans les régions chaudes, tempérées, avec le cycle saisonnier (acmé des pontes et de la population pendant les mois zénithaux). Cependant, dans la

nature (milieu tropical stable) ou expérimentalement (biotope tamponné du laboratoire), on peut observer des pontes pendant toute l'année, avec un maximum des pontes et de la densité de la population en saison zénithale.

II. — Particularités de l'habitat en fonction des groupes, genres ou espèces de mollusques vecteurs.

En dehors des facteurs biotiques et abiotiques généraux de l'habitat, il existe des sensibilités et des impératifs particuliers à certains groupes, genres ou espèces de vecteurs et, surtout, à leurs formes larvaires ou juvéniles. Nous apportons sur cette question des données qui ne peuvent être que liminaires, en recommandant l'ouverture de recherches nouvelles dans cette voie.

Les Planorbes s'adaptent plus facilement que les Bulins et que les Physopsis à des eaux polluées, à des biotopes putrides [limite de tolérance : 2 p. 1 000 de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et 0,1 p. 1 000 de NH_3], à des eaux chlorurés (limite de tolérance pour ClNa : 6 p. 1 000) et à des pH alcalins [pH des lacs du Congo belge à Biomphalaria : 8,5 à 9,8] ; leurs besoins alimentaires en phanérogames sont relatifs, ils sont très microphages, les bactéries, les protistes, les algues, les limons ou les boues nutritives peuvent suffire à leur nutrition ; il est probable que leurs besoins en azote sont plus grands que ceux des Bulininés et des Oncomélanies.

Les Bulininés (Bulins, *Physopsis*) ont, généralement, des habitats moins pollués que les Planorbinés : leur tolérance pour les sels ammoniacaux, pour l'ammoniaque et pour les chlorures est notablement inférieure à celle des Planorbes mais leur tolérance aux nitrates est meilleure ; le pH de l'eau de leurs gîtes est, généralement, acide ou neutre. La phytophagie des Bulins est plus stricte que celle des Planorbes et le couvert végétal de leurs gîtes en phanérogames est relativement important, ce qui implique un certain besoin de lumière.

Les *Oncomelania*, Prosobranches amphibiés ont, à la fois, des gîtes aquatiques et terrestres, à couvert végétal important. La riziére, les canalisations agricoles nombreuses, bordées de bambous et de haies, le terrain humique et mouillé, une insolation ménagée par une végétation abondante assurent la stabilité de température et d'humidité de ces gîtes mixtes.

Dans les gîtes aquatiques, les sols sableux et pierreux sont recherchés par les mollusques ; les sols acides, l'acidité légère de l'eau sont des facteurs favorables. La phytophagie des Oncomélanies est plus accentuée encore que celle des Bulininés ; dans les élevages, la cellulose pure est recherchée électivement, ce qui n'exclut pas une microphagie s'exerçant sur les algues et les Protistes. Les lieux de pontes sont choisis dans des situations

à la fois émergée et immergée avec des fluctuations, suivant les espèces.

Les *Ancylidés* du genre *Ferrissia* (*F. tenuis*), vecteurs d'une bilharziose urinaire aux Indes, sont de petits mollusques très délicats vivant fixés aux pierres et aux feuilles immergées et ayant des exigences biologiques qui sont relativement strictes : eaux claires, très oxygénées, chlorurées (ClNa : 2 p. 1 000), pH légèrement acide ; température élective : 26 à 30° C ; la phytophagie et la microphagie sont très sélectives.

III. — Possibilités d'établissement des constantes physiologiques de la reproduction dans l'habitat (facteurs essentiels de Horton).

La ponte, la vie larvaire et la jeunesse des mollusques vecteurs semblent ne s'effectuer que dans des limites correspondant à un état temporaire relativement stable et cyclique réalisant une combinaison de facteurs essentiels. Cet habitat se réalise, surtout, en saison sèche (régions tropicales), en été aux saisons zénithales (pays chauds), ou en milieu tamponné, au laboratoire. Ces constantes physiologiques de la reproduction ne se rencontrent que dans des « niches » qui peuvent varier d'un genre ou d'une espèce à l'autre.

Bien que les informations sur ce problème soient très restreintes, certains de ces facteurs essentiels peuvent être précisés : 1^o température (seuil, optima, plafond) ; 2^o minéralisation (seuil, optima, plafond) ; 3^o besoins alimentaires électifs (par exemple chaux, phosphore, protides, facteurs de croissance et vitamines). Certaines constantes physiologiques de la reproduction de *B. truncatus*, de *P. glabratus* et de *Ferrissia tenuis* ont pu être précisées au laboratoire, ce sont une température de 28 à 30° C, une concentration marquée de l'eau en oxygène, une minéralisation en chlorure de sodium de 2 p. 1 000, la présence de feuilles de mangues — et de la microflore ainsi que de la microfaune qui se développent du fait de la présence de celles-ci — l'addition de protides animaux (poudre de poisson) et de glucides.

INCIDENCE DE LA CONNAISSANCE DES FACTEURS CONDITIONNANT L'HABITAT SUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE ET SUR LA PROPHYLAXIE.

La connaissance de la biologie, du biotope et du climax, des mollusques vecteurs, est de nature à perfectionner les méthodes molluscocides et à les rendre plus efficaces.

La perméabilité des téguments des mollusques et, surtout, des larves et des formes juvéniles, leur osmo-régulation médiocre

les rendent très sensibles aux actions molluscocides chimiques et, en particulier, à la minéralisation de l'eau (ClNa) et à une action毒ique, éventuelle, des sels dissous (sels de Ba et de Cu), de composés organiques synthétiques (pentachlorophénates) ou de produits d'origine végétale (glucosides, saponine) mis en contact avec l'eau.

Des sels minéraux (sels de baryum, sels de zinc) et des produits, non solubles, toxogènes disposés par plages ou associés à des « attractifs » (comprimés pièges) peuvent agir par contact ou après ingestion et solubilisation dans l'économie des mollusques (transformation du carbonate de baryum en chlorure de baryum). L'emploi de tels agents molluscocides offrirait l'avantage d'une faible toxicité et d'une action rémanente.

Les actions molluscocides chimiques déjà largement exploitées (pentachlorophénate de sodium) peuvent être encore perfectionnées (briquettes et boulets lentement solubles).

Les *actions molluscocides biologiques* sont, généralement, considérées comme peu efficaces, elles ne sont, en effet, jusqu'à ce jour, qu'auxiliaires des actions molluscocides physico-chimiques (faucardage, molluscocides chimiques). Cependant, leur étude nous semble devoir être approfondie, il est probable qu'elles ne méritent pas le préjugé défavorable qui les frappe. Les ennemis, les prédateurs efficaces (crustacés, canards) et les maladies des mollusques vecteurs (infections, infestations parasitaires) existent et leur exploitation molluscocide (peuplements molluscocides ou substitutifs, acclimatements microbiens et parasitaires) doit être considérée plus attentivement malgré la difficulté d'intervenir sur les équilibres biologiques naturels.

Indépendamment des actions molluscocides, l'acclimatement et la substitution, dans les gîtes, d'une flore ou d'une faune défavorables ou inutilisables, à une flore ou à une faune favorables, est concevable. L'acclimatement d'une flore bactérienne ou de lits bactériens générateurs de produits de fermentations antimollusques, le surpeuplement de gîtes à vecteurs par des Limnées ou par d'autres mollusques non vecteurs sont des exemples indicatifs des orientations pouvant être données à de telles recherches.

Le cycle des variations saisonnières des populations de mollusques vecteurs pose le problème du choix des périodes optima d'application des molluscocides chimiques. Ces périodes ne correspondent pas nécessairement aux saisons répondant à l'acmé de la population et au moment où les formes larvaires et juvéniles, particulièrement sensibles aux actions molluscocides, apparaissent au sein de cette population. Comme il faut nécessairement atteindre les adultes plus résistants, il peut y avoir intérêt

à agir au moment où ceux-ci sont rassemblés (ouverture de la saison optima de la reproduction) dans des volumes d'eau les plus restreints possibles (saison sèche des régions tropicales, saison zénithale des pays chauds). Il peut y avoir, de ce chef, une économie de molluscocides et une augmentation d'efficacité. La nature nous guide à cet égard car il y a concordance entre l'ouverture de la saison sèche, la limitation des collections d'eau, la concentration des mollusques et le début de la période de reproduction. Sauf circonstances climatiques particulières, ce moment paraît propice aux actions molluscocides.

Sur le plan pratique de la prospection des gîtes à mollusques vecteurs, l'analyse chimique de l'eau d'un système aquatique donné permet d'indiquer (minéralisation qualitative et quantitative supérieure à la marge de tolérance) qu'une collection d'eau considérée ne peut être un gîte actuel. D'autre part, un bon prospecteur, en saison sèche, devra toujours rechercher, dans le sol des collections d'eaux taries ou partiellement asséchées, la présence de mollusques en anhydrobiose.

La similitude des facteurs généraux conditionnant l'habitat des mollusques vecteurs montre que toute la zone intertropicale et, dans une certaine mesure, les pays chauds frontaliers, pourraient fournir des biotopes et des climax favorables aux mollusques vecteurs et en corollaire des foyers de bilharziose (dépistage des nouveaux foyers de l'Oubangui Chari (Le Gac et Gaud, 1952) et de la province de Bombay (Shah et Gadgil, 1955, *op. cit.*)). Bien qu'il soit notoire que de vastes territoires intertropicaux ou chauds sont indemnes de bilharzioses ou de vecteurs connus de celles-ci, le danger d'implantation des bilharzioses dans ces régions ne saurait être exclu, en raison : 1^o de la possibilité de l'extension spontanée (œufs et formes juvéniles entraînés par les oiseaux aquatiques, les buffles d'eau et le nomadisme) ou accidentelle (échange de mollusques vecteurs entre laboratoires, essais zoologiques d'acclimatation) de la distribution géographique d'espèces vectrices ; 2^o de l'aptitude éventuelle des *Miracidia* des schistosomes humains de s'adapter à de nouveaux mollusques Pulmonés (cas de *Ferrissia tenuis*) ou Prosobranches. Même si ces risques sont limités, les organisations sanitaires doivent en être informées et prendre des dispositions antagonistes éventuelles.

SUMMARY

FACTORS CONDITIONING THE HABITAT OF *Bilharzia* VECTOR MOLLUSCS ;
THEIR IMPORTANCE FOR THE EPIDEMIOLOGY OF BILHARZIOSIS.

The author stresses the following facts as being important both in the biological and ecological fields.

I. General characters of the habitat of vector molluscs (physico-chemical and biological factors).

Stagnant or slowly running tepid shallow fresh-water, receiving not too much sunlight, containing more or less zoophytic associations and situated in hot or intertropical regions. Physico-chemical factors (biotopes) : optimal medium temperature 22-26° C, less than 2 meters depth, less than 6 g p. 1 000 NaCl are essential for *Planorbis glabratus*. The essential biological factors are nutrimental (elective phytophagy, microphagy, stability of the metabolic cycle of the nutrient material) and competitive (flora and fauna of the climax, natural enemies, predatory animals, infectious and parasitical diseases).

II. Dependence of the various zoological groups of vectors on the particulars of the habitat.

The *Planorbinae* are essentially microphages, relative phytophages, adaptable to putrid fermentation and relatively strong mineral concentrations (NaCl, 6 p. 1 000) ; they need rather important quantities of proteins. The *Bulininae* are stronger phytophages than *Planorbinae* and for that reason need more sunlight ; they are more sensitive to putrid fermentations and to high mineral concentrations. The *Oncomelania* and *Prosobranch* group, being amphibia, need acid soils and water, medium sunlight and abundant vegetation (phytophages). The *Ancylidae* (*Ferrissia tenuis*) show very strict biological claims (highly oxygenated, chloride containing [NaCl, 2 p. 1 000], acid, warm [26-30° C] water). They are microphages.

III. Constant physiological conditions for reproduction (Horton's essential factors).

These factors (temperature, mineralisation, alimentary needs) proper for certain groups of species, consist in certain temporary and cyclic local environment conditions (« niches ») allowing reproduction and commanding the geographical spread of each species.

As to the epidemiology and prophylaxis the following considerations are to be mentioned :

I. For the extirpation of vector molluscs by physico-chemical methods much profit may be derived from the knowledge about their habitat and biology (turning up of soil, soluble and insoluble chemical molluscocides, predatory or competitive animals, mortal effect of fermentations, infectious or parasitical diseases of the molluscs).

II. Profit derived from the knowledge of habitat conditions by prospecting campaigns (control of zoophytic associations, chemical analysis of water).

III. Risk of new mollusc species adapting themselves to the condition of intermediate hosts for *Schistosoma* (newly discovered infection centers in the Bombay and Oubangui Chari regions).

BIBLIOGRAPHIE

- [4] IZUMI (S.). *Japan med. J.*, 1951, **4**, 125.
- [2] *School trop. a. prev. Med., Coll. Med. Evang., Loma Linda, Calif., Prog. Rep. I-IV a. Ann. Prog. Rep.*, 1953-1954.
- [3] SHAH (S. N.) et GADGIL (R. K.). *Ind. J. med. Res.*, 1955, **43**, 689.
- [4] SHAH (S. N.) et GADGIL (R. K.). *Ind. J. med. Res.*, 1955, **43**, 703.
- [5] GADGIL (R. K.) et SHAH (S. N.). *Ind. J. med. Res.*, 1955, **43**, 695.

RECHERCHES SUR LE RÔLE DES CATIONS DANS LA FIXATION DES BACTÉRIOPHAGES SUR LES BACTÉRIES SENSIBLES

II. ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE

par J. DIRKX, J. BEUMER et M. P. BEUMER-JOCHMANS (*)

(Institut Pasteur de Bruxelles)

INTRODUCTION.

Nous avons montré précédemment [1] le rôle joué par différents cations dans la fixation du phage H-SHPB(Ca) sur différents germes sensibles. Nous avons pu montrer que les différents ions nécessaires à la fixation n'interviennent que par leur charge, qu'ils peuvent se remplacer mutuellement et que les ions bivalents sont environ vingt fois plus actifs que les monovalents. Enfin, nous insistions sur la nécessité de reprendre l'étude de la fixation sur des bases physico-chimiques en tenant compte, notamment, de l'existence d'une double couche ionique à la surface des particules en présence. Le but du présent travail est précisément de réaliser cette étude et de voir dans quelle mesure des considérations électrochimiques permettent d'expliquer les résultats expérimentaux du travail précédent.

Dans ce but, nous avons surtout étudié le comportement électrophorétique du phage et des bactéries pour déterminer le potentiel de ces microorganismes considérés comme des particules colloïdales et, de ces valeurs de potentiel, nous avons tenté de déduire quelle devait être l'interaction entre le phage et la bactérie. Nous avons alors comparé nos résultats expérimentaux aux valeurs d'interactions obtenues et essayé d'interpréter ceux-là en fonction de celles-ci.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Phage, souches bactériennes, milieu utilisé pour la mise en évidence de la fixation, titrage du phage, mesure de conductivité et dosages d'ions.

Ces méthodes ont été décrites précédemment [1].

(*) Manuscrit reçu le 10 mars 1957.

ELECTROPHORÈSE. — Toutes les électrophorèses ont été effectuées dans l'appareil d'Antweiler, modifié de façon à permettre la détermination des mobilités. Ces modifications consistent :

1^o Dans le remplacement de la source de courant de l'appareil original (courant redressé, non filtré) par une source à courant continu filtré, doublement stabilisé par système feedback et tube à néon. De plus, le courant alternatif d'entrée est également stabilisé par un transformateur à saturation.

2^o Dans l'interposition, devant le canal de migration de la cuve, d'un réseau gradué en cinquièmes de millimètre (1) et permettant de déterminer la distance parcourue par le constituant étudié sous l'influence du champ.

Par ailleurs, la connaissance de la résistance spécifique du tampon et de la section du canal de migration d'une part, et la mesure de l'intensité passant dans la cuve d'autre part, permettent, par une relation simple, le calcul du champ :

$$H = i \cdot \rho / S \quad . \quad (1)$$

i = intensité de courant,

ρ = résistance spécifique du tampon,

S = section du canal de migration.

ELECTROPHORÈSE DES BACTÉRIES. — Pour suivre la migration des bactéries dans la cuve électrophorétique, un dispositif supplémentaire d'éclairage indirect a été utilisé. Il fait apparaître la migration bactérienne sous la forme d'une colonne blanche se détachant sur un fond noir. Cette méthode est beaucoup plus sensible qu'une méthode opacimétrique et permet de suivre la migration avec beaucoup plus de précision. La détermination des mobilités bactériennes se fait en mesurant le temps nécessaire pour que, sous un courant donné i , les bactéries aient migré d'une distance donnée l . La mobilité U est alors donnée par la relation simple :

$$U = l / H t \quad . \quad (2)$$

où H est donné par l'équation (1).

ELECTROPHORÈSE DU PHAGE. — Le déplacement du phage dans la cuve d'électrophorèse ne pouvant être suivi avec certitude, ni par voie opacimétrique, ni par voie néphéломétrique, ni par voie réfractométrique au moyen du dispositif de Philpot et Svensson, nous avons utilisé la méthode de Hittorf basée sur le comptage des particules. Le phage est introduit dans la cuve, dans le milieu adéquat. On laisse passer le courant pendant un temps arbitrairement choisi, ensuite, on isole le canal où s'est produite la

(1) Fabriqué par Boskamp Geräte-Bau, Hersel b. Bonn.

migration. Le contenu de ce canal est prélevé en totalité et le phage présent y est titré.

Dans ces conditions, soient :

n_0 le nombre de particules de phage par centimètre cube dans la suspension de départ ;

n le nombre de particules de phage ayant migré sous l'influence du courant et

t le temps de migration.

La mobilité est donnée par la relation :

$$U = n/n_0 \cdot 1/HtS \quad (3)$$

ou, en substituant la valeur de H donnée par l'équation (1) :

$$U = n/n_0 \cdot 1/i \cdot q \cdot t. \quad (4)$$

Cette dernière équation a été utilisée pour les calculs.

Nous avons, de plus, vérifié que la diffusion libre du phage dans la cuve pendant un temps identique à celui de l'électrophorèse n'introduit pas d'erreur appréciable dans le calcul des mobilités.

PRÉPARATION DES SUSPENSIONS BACTÉRIENNES POUR L'ÉLECTROPHORÈSE. — Des cultures de 5 à 6 heures en bouillon ordinaire à 37° C sont centrifugées dix minutes à 3 000 t/min, le liquide surnageant est décanté au maximum et les bactéries remises en suspension dans le maléate choisi. Aucun lavage n'est effectué de manière à diminuer les chances d'altération de la surface des germes. Les suspensions ainsi préparées sont immédiatement soumises à l'électrophorèse. Elles présentent d'ailleurs une bonne stabilité électrophorétique, des mobilités identiques ayant été retrouvées avec des suspensions laissées plus de vingt-quatre heures à 23° C.

PRÉPARATION DES SUSPENSIONS DE PHAGE. — Un lysat bactérien en bouillon calcifié (environ 2 l) est centrifugé pendant deux heures à 40 000 g, dans une ultracentrifugeuse Spinco modèle L, après filtration préalable sur papier pour le débarrasser des plus gros débris microbiens. Les culots sont remis en suspension dans 10 à 20 cm³ de bouillon stérile et recentrifugés quinze minutes à 4 000 g pour éliminer les débris et divers matériaux inertes. La suspension est ensuite centrifugée une heure à 100 000 g et le culot repris dans 2 cm³ de bouillon. La suspension est stérilisée par contact pendant une heure avec du toluol, puis décantée, titrée et conservée en glacière à +4° C jusqu'au moment de l'emploi. Malgré sa grande complexité ionique, le bouillon a été préféré à tout autre milieu de resuspension parce que le plus favorable à la conservation du phage. Les ions du bouillon jouent

certainement un rôle négligeable dans l'électrophorèse grâce au fait que, la suspension obtenue étant très concentrée en phage (de l'ordre de 10^{11} particules par centimètre cube), elle peut être diluée environ dix mille fois dans le milieu adéquat au moment de l'électrophorèse.

RÉSULTATS D'ÉLECTROPHORÈSE.

Bactéries. — Les mobilités électrophorétiques des bactéries ont été déterminées directement suivant la méthode décrite plus haut. Ces mobilités sont résumées dans le tableau I pour les ions monovalents.

TABLEAU I.

| Mobilité électrophorétique des bactéries dans différentes conditions ioniques. | | | | | |
|---|------------|-----------|------|---------|------|
| Conditions ioniques | Type d'ion | Bactéries | | | |
| | | F6R | F6S | SHPB(R) | Y6R |
| Maléate 4.10^{-2} M (M^+) = 8.10^{-2} M $\mathcal{U} = 12.10^{-2}$ $K = 1.133.10^7 \text{ cm}^{-1}$ $K.r = 900$ | NH_4^+ | 5,84 | 4,45 | 8,04 | — |
| | Na^+ | 6,52 | 4,24 | 6,44 | 6,74 |
| | K^+ | 7,51 | 3,45 | 7,60 | — |
| Maléate 10^{-2} M (M^+) = 2.10^{-2} M $\mathcal{U} = 3.10^{-2}$ $K = 0,566.10^7 \text{ cm}^{-1}$ $K.r = 449,5$ | NH_4^+ | 9,18 | 3,45 | 8,76 | — |
| | Na^+ | 7,28 | 3,59 | 7,62 | 7,74 |
| | K^+ | 7,62 | 2,78 | 8,48 | — |
| Maléate 4.10^{-3} M (M^+) = 8.10^{-3} M $\mathcal{U} = 12.10^{-3}$ $K = 0,358.10^7 \text{ cm}^{-1}$ $K.r = 284$ | NH_4^+ | 8,13 | 3,75 | 8,33 | — |
| | Na^+ | 8,21 | 4,12 | 8,60 | 8,39 |
| | K^+ | 8,16 | 3,55 | 8,90 | — |

Dans ce tableau, les mobilités sont exprimées en microns.cm.Volt $^{-1}$. sec $^{-1}$. Chaque chiffre est la moyenne d'au moins trois résultats concordants. [M^+] est la concentration ionique de l'ion monovalent étudié, μ est la force ionique du milieu, κ est le paramètre de la théorie des électrolytes forts de Debye et Hückel, défini par la relation : $\kappa = \sqrt{4.\pi.N.e^2. \mu/1\,000 \epsilon.k.T}$ où N est le nombre d'Avogadro, e la charge de l'électron, ϵ la constante diélectrique du milieu, k la constante de Boltzmann et T la température absolue. A la température ordinaire, dans l'eau, on a la relation : $\kappa = 0,327.10^8$. $\sqrt{\mu.r}$ est le rayon équivalent de la bactérie (voir texte).

Comme on le voit dans le tableau I, les mobilités bactériennes varient spécifiquement avec l'ion choisi aux fortes concentrations.

Cet effet n'a rien de surprenant, il est connu depuis longtemps pour les protéines et a été décrit par différents auteurs. Ces différences s'atténuent d'ailleurs aux faibles concentrations.

Il nous intéresse davantage de remarquer tout d'abord que les bactéries du type R, bien que d'espèces différentes, ont toutes une mobilité très voisine. D'autre part, la souche S du Flexner 6 possède une mobilité considérablement plus réduite. Le fait n'est pas nouveau et a déjà été décrit en 1936 par Moyer pour les formes R et S du colibacille [3]. Il méritait toutefois d'être signalé et nous verrons plus loin l'importance qu'on peut lui attribuer dans le phénomène de fixation du phage.

La théorie de l'électrophorèse permet de prévoir, et l'expérience confirme que la présence d'ions bivalents réduit considérablement la mobilité. Il nous a semblé intéressant de voir comment se comportaient, à l'électrophorèse, nos souches bactériennes, dans une zone de concentrations voisine de celles qui sont les plus favorables à la fixation du phage.

Les mobilités des germes dans ces conditions sont résumées dans le tableau II.

TABLEAU II.

| Mobilités électrophorétiques des bactéries en présence d'ions bivalents | | | | | |
|--|------------------|-----------|------|---------|------|
| Conditions ioniques | Type d'ion | Bactéries | | | |
| | | F6R | F6S | SHPB(R) | Y6R |
| Maléate 4.10^{-2} M (M^{++}) = 4.10^{-2} M $\mu = 16.10^{-2}$ $K = 1,308.10^7 \text{ cm}^{-1}$ $K_r = 1.039$ | Ca ⁺⁺ | 2,90 | 1,57 | 3,10 | 2,84 |
| | Mg ⁺⁺ | 3,77 | 2,10 | 3,77 | — |
| | Sr ⁺⁺ | 3,94 | 2,57 | 4,36 | — |
| Maléate 2.10^{-3} M (M^{++}) = 2.10^{-3} M $\mu = 8.10^{-3}$ $K = 0,292.10^7 \text{ cm}^{-1}$ $K_r = 232$ | Ca ⁺⁺ | 3,61 | 2,06 | 3,69 | 4,74 |
| | Mg ⁺⁺ | 3,72 | 1,86 | 3,66 | — |
| | Sr ⁺⁺ | 3,81 | 1,85 | 3,65 | — |
| | Ba ⁺⁺ | 3,53 | 1,45 | 3,15 | — |
| Maléate 4.10^{-4} M (M^{++}) = 4.10^{-4} M $\mu = 16.10^{-4}$ $K = 0,131.10^7 \text{ cm}^{-1}$ $K_r = 104$ | Ca ⁺⁺ | 3,48 | 1,92 | 3,36 | 4,65 |
| | Mg ⁺⁺ | 3,48 | 1,64 | 3,30 | — |
| | Sr ⁺⁺ | 3,70 | 1,76 | 3,62 | — |
| | Ba ⁺⁺ | 3,25 | 1,86 | 3,34 | — |

Les symboles et les unités sont ceux du tableau I.

N. B. — Il n'a pas été possible de préparer un maléate de baryum à la concentration de 4.10^{-2} M, le produit précipitant dans ces conditions.

Si l'on examine le tableau II, on voit qu'ici encore se manifeste l'effet spécifique des différents ions aux fortes concentrations. Cependant, on remarque immédiatement, une fois de plus, l'homogénéité du groupe des bactéries R. Il est frappant de constater également que, en présence d'ions bivalents, comme en présence d'ions monovalents, la mobilité du F6S est approximativement la moitié de celle des germes R. Insistons enfin sur le fait que les germes R, en présence d'ions bivalents, ont une mobilité approximativement moitié de celle qu'ils possèdent en présence d'ions monovalents. Ceci revient à dire également que la mobilité d'un bacille du type R, en présence d'ions bivalents, se rapproche de celle d'un bacille du type S en présence d'ions monovalents.

Ces différentes valeurs de mobilité ont servi à calculer les potentiels ζ correspondants. Pour ce faire, nous avons fait une hypothèse simplificatrice qui consiste à considérer les bactéries comme sphériques. Apparemment paradoxale, cette hypothèse est cependant parfaitement justifiée par les considérations suivantes : la courbure d'une bactérie, en n'importe quel point de la surface bactérienne, est toujours négligeable par rapport à l' « épaisseur » de la double couche ionique qui l'entoure pour des forces ioniques supérieures à 10^{-5} . Autrement dit, le produit πr est très grand devant 1 aux concentrations que nous avons utilisées. Il suffit de considérer les tableaux I et II pour se convaincre que dans notre cas il en est bien ainsi. Pour les grandes valeurs de πr , la formule permettant de calculer la valeur du potentiel ζ devient indépendante de la forme de la particule et est :

η = viscosité du milieu,

U = mobilité,

ϵ = cte diélectrique,

$$\zeta = 4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot U / \epsilon \quad (5)$$

Pour des raisons de simplicité de calcul, nous avons dans la suite choisi une forme de rayon constant, c'est-à-dire une sphère. La « sphère équivalente » à la bactérie est définie comme celle ayant un volume égal au corps bactérien. Déterminé par calcul, son rayon vaut environ 800 millimicrons.

Les valeurs de potentiel ζ calculées par cette formule sont résumées dans le tableau III. Ces valeurs sont évidemment directement proportionnelles aux mobilités et on trouve entre elles les mêmes différences et les mêmes rapports que ceux déjà signalés dans les tableaux I et II pour les mobilités.

ELECTROPHORÈSE DU PHAGE. — Comme décrit plus haut, l'électrophorèse du phage a été réalisée en utilisant la méthode de Hittorf et les valeurs de mobilité sont données par la formule (4). Le phage II-SHPB(Ca) paraît assez difficile à purifier suffisam-

TABLEAU III.

| | | Potentiel \mathcal{L} des bactéries dans différentes conditions ioniques | | | |
|------------|---------------|--|------|---------|-------|
| Type d'ion | Concentration | Bactéries | | | |
| | | F6R | F6S | SHPB(R) | Y6R |
| NH_4^+ | $8.10^{-2} M$ | 77,6 | 59,1 | 106,8 | — |
| | " | 86,6 | 56,3 | 85,6 | 89,5 |
| | " | 99,8 | 45,8 | 101 | — |
| Na^+ | $2.10^{-2} M$ | 122 | 45,8 | 116,4 | — |
| | " | 96,8 | 47,7 | 101,2 | 103 |
| | " | 101,2 | 36,9 | 112,7 | — |
| K^+ | $8.10^{-3} M$ | 108 | 49,8 | 110,7 | — |
| | " | 109,2 | 54,8 | 114,3 | 111,3 |
| | " | 108,4 | 47,2 | 118,2 | — |
| Ca^{++} | $4.10^{-2} M$ | 38,5 | 20,9 | 41,2 | 37,7 |
| | " | 50,1 | 27,9 | 50,1 | — |
| | " | 52,4 | 34,1 | 57,9 | — |
| Mg^{++} | $2.10^{-3} M$ | 48,0 | 27,4 | 49,0 | 63,0 |
| | " | 49,4 | 24,7 | 48,6 | — |
| | " | 50,6 | 24,6 | 48,5 | — |
| | " | 46,9 | 19,3 | 41,9 | — |
| Sr^{++} | $4.10^{-4} M$ | 46,3 | 25,5 | 44,6 | 61,8 |
| | " | 46,3 | 21,8 | 43,9 | — |
| | " | 49,2 | 23,4 | 48,1 | — |
| | " | 43,2 | 24,7 | 44,4 | — |
| Ba^{++} | $4.10^{-4} M$ | 46,3 | 25,5 | 44,6 | 61,8 |
| | " | 46,3 | 21,8 | 43,9 | — |
| | " | 49,2 | 23,4 | 48,1 | — |
| | " | 43,2 | 24,7 | 44,4 | — |

Toutes les valeurs de potentiel sont exprimées en millivolts $\eta = 0,94$ centipoise, $\epsilon = 80$.

ment pour utiliser une méthode optique. En effet, la lyse bactériophagique montre, au microscope électronique, la libération d'abondantes granulations qui sédimentent probablement avec le phage au cours de l'ultracentrifugation, ainsi qu'on peut s'en rendre compte par l'expérience suivante.

Un lysat bactérien, filtré, est centrifugé par la méthode décrite plus haut, et le phage, repris dans un petit volume de maléate de calcium $2.10^{-3} M$, y est titré. Le phage est ensuite recentrifugé et après décantation du maléate, le culot est lyophilisé dans un tube taré puis pesé. Le « poids moléculaire » du phage déterminé de cette manière est de l'ordre de 100.10^6 , tandis que celui estimé d'après les dimensions du phage relevées au microscope électronique et sur la base d'une densité de 1,3 est de 220.10^6 .

soit environ cinq cents fois plus petit et probablement cette dernière valeur est-elle beaucoup plus proche de la réalité. Ceci revient à dire qu'il n'y aurait que 0,2 p. 100 de phage pur dans le résidu sec des culots de centrifugation.

Dès lors, plutôt que de chercher une méthode longue et compliquée de purification, nous avons préféré une méthode d'électrophorèse basée, dans ce cas, sur une propriété spécifique de la particule étudiée. La méthode de Hittorf répond bien à cette exigence et permet, d'autre part, un tel degré de dilution qu'elle élimine l'intervention possible d'ions étrangers à ceux du tampon.



FIG. 1. — Deux phages H-SHPB(Ca) photographiés au microscope électronique. La distance entre les deux traits, au bas de la photo vaut un micron.

Dans le cas du phage, le calcul du potentiel ζ exige un certain nombre d'hypothèses simplificatrices, dont la validité est évidemment moins certaine que pour les bactéries, en sorte que les résultats suivants doivent être plutôt considérés comme des approximations que comme des valeurs absolues.

L'équation générale de l'électrophorèse peut être mise sous la forme :

$$\zeta = F \cdot U / \epsilon \quad (6)$$

où U est la mobilité électrophorétique, ϵ la constante diélectrique du milieu et F une fonction plus ou moins compliquée du coefficient de friction de la particule considérée et du produit $\pi \cdot r$.

Le coefficient de friction d'une particule n'a pu être calculé que pour des formes relativement simples telles que sphère, cylindre ou ellipsoïde de révolution. La forme du phage étant assez

complexe, en gros, une sphère fixée à un long cylindre, et les coefficients de friction n'étant pas additifs, il est impossible de calculer, *a priori*, ce coefficient pour le phage. Il nous a donc fallu choisir arbitrairement pour ce dernier une forme simple à coefficient de friction connu. Dans les calculs nous avons considéré le phage comme un cylindre de même longueur et de même volume que le phage naturel. Les dimensions du phage ont été relevées sur des photos prises au microscope électronique et les valeurs moyennes de ces mesures sont reprises dans la figure 2. Pour le calcul du cylindre équivalent, nous avons considéré la queue du phage comme cylindrique et la tête, étant donné son asymétrie, comme un ellipsoïde de révolution. On trouve alors, pour le cylindre équivalent, les dimensions suivantes :

Longueur : 315 millimicrons,

Rayon : 17 millimicrons,

à partir d'un volume total de 280 000 millimicrons-cubes.

De plus, nous basant sur le fait que le phage manifeste un point de fixation nettement préférentiel (le bout de la queue), il

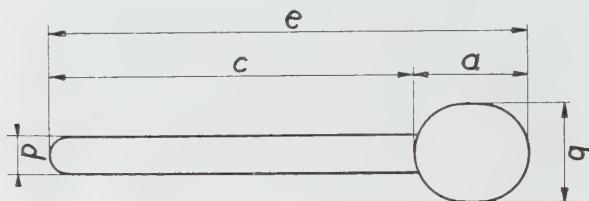


FIG. 2. — Valeurs moyennes des principales dimensions du phage H-SHPB(Ca) déterminées par microscopie électronique : $a = 75 \text{ m}\mu$; $b = 65 \text{ m}\mu$; $c = 240 \text{ m}\mu$, $d = 25 \text{ m}\mu$; $e = 315 \text{ m}\mu$.

nous a semblé logique de retoucher l'image un peu grossière du cylindre équivalent en dotant ce dernier d'un dipôle électrique permanent. La conséquence en est l'orientation du cylindre équivalent parallèlement au champ électrique au cours de la migration électrophorétique. Si l'on admet la validité des hypothèses précédentes, le potentiel est donné par la relation :

$$\xi = 4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot U / \epsilon$$

expression identique à la formule (5).

L'hypothèse du dipôle permanent est évidemment assez gratuite, elle n'entraîne toutefois pas de conséquences trop graves, mais offre, en revanche, une certaine facilité de calcul. En effet, si le dipôle n'existe pas, cela revient à dire qu'au cours de la migration électrophorétique les cylindres équivalents sont orientés de

manière quelconque. Dans ce cas, le coefficient de friction devient une fonction du produit $\kappa \cdot r$, augmentant jusqu'à la valeur limite de $6,67 \pi \cdot \eta$ quand ce produit tend vers 0. Dans les conditions les plus défavorables de nos expériences (maléate de Ca $4 \cdot 10^{-4}$ M), le coefficient de friction en l'absence d'orientation des particules vaudrait $5,6 \pi \cdot \eta$, soit un résultat d'environ 30 p. 100 plus élevé pour le potentiel ζ qu'avec nos hypothèses. L'erreur est en tout cas inférieure à 20 p. 100 dans tous les autres cas et devient négligeable pour les valeurs de $\kappa \cdot r$ égales ou supérieure à 10. Comme nos calculs, nous l'avons dit, ne tendent pas à une grande précision, mais visent plutôt à donner un ordre de grandeur, l'hypothèse de l'orientation est donc admissible et probablement plus proche de la réalité.

Les résultats d'électrophorèse du phage sont résumés dans le tableau IV.

TABLEAU IV.

| Electrophorèse du phage H ⁻ | | | | | | |
|--|------------------|--------------------|----------------------|------------------|------|--------------|
| Conditions ioniques | Ion | Force ionique | $\kappa \times 10^7$ | $\kappa \cdot r$ | U | φ mV |
| Maléate de Na $4 \cdot 10^{-2}$ | Na ⁺ | $12 \cdot 10^{-2}$ | 1,13 | 19 | 1,48 | 19,6 |
| Maléate de Na 10^{-2} | Na ⁺ | $3 \cdot 10^{-2}$ | 0,567 | 9,52 | 1,82 | 24,2 |
| Maléate de Na $4 \cdot 10^{-3}$ | Na ⁺ | $12 \cdot 10^{-3}$ | 0,358 | 6,02 | 1,37 | 18,2 |
| Maléate de Ca $4 \cdot 10^{-2}$ | Ca ⁺⁺ | $16 \cdot 10^{-2}$ | 1,308 | 22 | 0,14 | 1,86 |
| Maléate de Ca $2 \cdot 10^{-3}$ | Ca ⁺⁺ | $8 \cdot 10^{-3}$ | 0,292 | 4,91 | 1,36 | 18,0 |
| Maléate de Ca $4 \cdot 10^{-4}$ | Ca ⁺⁺ | $16 \cdot 10^{-4}$ | 0,131 | 2,2 | 1,07 | 14,2 |

Les mobilités sont exprimées en microns. cm. Volt⁻¹. Sec.⁻¹. $\eta = 0,94$ centipoise. $\epsilon = 80$.

Comme on le voit, le potentiel du phage est sensiblement plus petit que celui des bactéries en même temps qu'il dépend notablement plus de la concentration des ions. Enfin, l'effet atténuateur des ions bivalents est, dans l'ensemble, moins marqué que pour les bactéries. Il faut aussi remarquer un résultat apparemment paradoxal, à savoir que le potentiel le plus élevé est précisément atteint aux conditions ioniques où la fixation devient possible (maléate de Na 10^{-2} M et maléate de Ca $2 \cdot 10^{-3}$ M).

On peut, à partir de ces valeurs, calculer la charge totale du phage et, la surface de cette particule étant connue, calculer la densité superficielle moyenne de charge en utilisant pour cela la formule de Gorin [4] :

$$Q = \frac{\zeta \cdot (L + 2r) \epsilon}{2} \cdot \frac{K_1(\kappa \cdot r) - \kappa \cdot r}{K_0(\kappa \cdot r)} \quad (7)$$

Dans cette formule, L est la longueur du cylindre, r son rayon, K_1 et K_0 des fonctions d'asymétrie de Bessel, variables en fonction du produit $\pi \cdot r$. Les autres symboles ont leur signification usuelle. Le rapport K_1/K_0 peut être trouvé dans des tables. Il se rapproche de 1 pour des valeurs de $\pi \cdot r$ voisines de 6 ou 7. Les valeurs de charge ainsi obtenues ont été résumées dans le tableau V.

TABLEAU V.

| Charge du phage H ⁻ | | | |
|--------------------------------|--------------------|--------|----------------------|
| Conditions ioniques | ΔmV | Charge | Densité de charge |
| Na ⁺ | 8.10 ⁻² | 19,6 | 3,6.10 ³ |
| | 2.10 ⁻² | 24,2 | 2,23.10 ³ |
| | 8.10 ⁻³ | 18,2 | 1,12.10 ³ |
| Ca ⁺⁺ | 4.10 ⁻² | 1,86 | 0,4.10 ³ |
| | 2.10 ⁻³ | 18,0 | 0,94.10 ³ |
| | 4.10 ⁻⁴ | 14,2 | 0,36.10 ³ |

Afin d'être plus facilement interprétables, les charges sont exprimées en nombre de charges électroniques élémentaires. De même, les densités de charge sont exprimées en nombre de charges électroniques élémentaires par micron-carré.

On voit d'après ce tableau que la charge totale du phage varie, suivant les conditions ioniques, entre les valeurs extrêmes de 360 et de 3 600 charges électroniques élémentaires par particule de phage. Ici apparaît de manière beaucoup plus nette le rôle joué par les ions bivalents qui, par leur présence, réduisent assez notablement la charge du phage.

Puck et ses collaborateurs [5] interprètent l'action des ions dans la fixation comme une neutralisation par ceux-ci des charges négatives portées par le phage. En effet, dans le cas où l'on pose le problème sous l'angle purement électrostatique, il faut remarquer que, pour que la force de répulsion électrostatique entre deux particules, régie par la loi de Coulomb, s'annule, il suffit que l'une des charges, et non les deux, soit annulée. Comme la charge du phage est plus faible que celle de la bactéries, il est évident que dans le système phage-bactéries, la charge du phage sera plus vite et plus facilement neutralisée que celle de la bactéries. Autrement dit, la fixation aurait lieu lorsque la charge bactériophagique serait neutralisée par les ions environnantes. Par conséquent, la neutralisation au sens chimique ou électrique du terme peut être réalisée pour le phage chaque fois que la concentration en charges positives, aux abords immédiats

de la bactérie, excède la densité de charge du phage. Or, la densité de distribution des ions au voisinage d'une particule chargée est calculable pour autant que la surface de la particule puisse être considérée comme plane, ce qui est, nous l'avons vu, le cas des bactéries. Si nous considérons un plan voisin de la surface bactérienne, par exemple le plan du potentiel ζ , distant de quelques angströms de la surface bactérienne proprement dite, la densité des charges ioniques positives dans ce plan sera donnée par la relation :

$$\sigma = \left[\frac{NekT}{2000\pi} \cdot \sum C_i (e^{-z_i e\zeta/kT} - 1) \right]^{1/2} \quad (8)$$

si l'on néglige la très faible contribution apportée par les ions de signe identique à celui de la particule et qui, dans ce voisinage,

TABLEAU VI.

| Densité de charge dans le plan ζ des bactéries. | | | | |
|---|-------------------|---------|-------------------|-------------------|
| Conditions ioniques | | Germes | σ_1 | σ_2 |
| Na^+ | $8 \cdot 10^{-2}$ | F6R | $2,48 \cdot 10^4$ | $5,17 \cdot 10^5$ |
| | | F6S | 1,34 " | 2,89 " |
| | | SHPB(R) | 2,41 " | 5,02 " |
| | | Y6R | 2,80 " | 5,84 " |
| | $2 \cdot 10^{-2}$ | F6R | 1,51 " | 3,14 " |
| | | F6S | 0,557 " | 1,16 " |
| | | SHPB(R) | 1,64 " | 3,42 " |
| | | Y6R | 1,69 " | 3,53 " |
| | $8 \cdot 10^{-3}$ | F6R | 1,20 " | 2,50 " |
| | | F6S | 0,367 " | 0,765 " |
| | | SHPB(R) | 1,24 " | 2,58 " |
| | | Y6R | 1,27 " | 2,64 " |
| Ca^{++} | $4 \cdot 10^{-2}$ | F6R | 1,45 " | 3,02 " |
| | | F6S | 0,682 " | 1,42 " |
| | | SHPB(R) | 1,61 " | 3,36 " |
| | | Y6R | 1,41 " | 2,94 " |
| | $2 \cdot 10^{-3}$ | F6R | $4,69 \cdot 10^3$ | $9,78 \cdot 10^4$ |
| | | F6S | 2,07 " | 4,31 " |
| | | SHPB(R) | 4,88 " | 10,2 " |
| | | Y6R | 8,32 " | 17,3 " |
| | $4 \cdot 10^{-4}$ | F6R | 1,95 " | 4,09 " |
| | | F6S | 0,844 " | 1,76 " |
| | | SHPB(R) | 1,85 " | 3,85 " |
| | | Y6R | 3,55 " | 7,40 " |

σ_1 = densité superficielle de charge en unités C. G. S. σ_2 = densité superficielle de charge exprimée en nombre de charge électroniques élémentaires par micron-carré.

sont repoussés très loin de la surface et ne jouent pratiquement aucun rôle. Dans cette formule, N est le nombre d'Avogadro, k la constante de Boltzmann, T la température absolue, C_i la concentration moléculaire du cation d'espèce i , z_i la valence de ce cation et e la charge de l'électron en valeur absolue. Il est à remarquer que, malgré le signe moins, l'argument de l'exponentielle est positif à cause de la valeur négative du potentiel ξ . Au moyen de cette formule, nous avons calculé la répartition des charges ioniques dans le plan ξ . Les résultats sont résumés dans le tableau VI.

Si l'on compare les résultats du tableau VI à ceux du tableau V, on voit immédiatement que la densité ionique des charges positives autour des bactéries est toujours supérieure, dans la zone des concentrations étudiées, à la densité électrique superficielle du phage dans les mêmes conditions, et ce d'environ cinq fois en moyenne pour tous les germes R. On pourrait donc s'attendre à ce que, s'il ne s'agit que d'une simple neutralisation électrique, le phage se fixe sur la bactérie dans ces conditions. Or on a vu [4] qu'il n'en est rien et que les plus faibles concentrations $[(Na^+)] = 8.10^{-3}$ et $[(Ca^{++})] = 4.10^{-4}$ ne donnent pas de fixation. Il semble donc que, si Puck a raison sur la nature même du phénomène, l'interprétation soit un peu plus délicate que celle de la neutralisation et qu'il faille, entre autres choses, considérer que chacune des particules est environnée d'une couche diffuse d'ions et possède un potentiel de surface déterminé. Il faudrait tenir compte en même temps des interactions ioniques et des interactions particulières. Ceci revient à poser la question comme un problème de stabilité de colloïdes et nous allons examiner si une solution plus raffinée ne peut être donnée de cette manière.

LA FIXATION DU PHAGE, CONSIDÉRÉE COMME UN PROBLÈME DE STABILITÉ DE COLLOÏDES. — Nous avons donc, pour les raisons exposées à la fin du paragraphe précédent, traité le problème de la fixation en le ramenant à l'étude des interactions pouvant exister entre deux particules colloïdales, en tenant compte, notamment, des potentiels électriques et de l'existence d'une double couche constituée, d'une part, par les charges négatives portées par les particules et, d'autre part, par les ions positifs se comportant comme un gaz aux abords immédiats de cette particule.

Le rôle des ions dans la stabilité des colloïdes est connu depuis longtemps et exprimé notamment de manière empirique par la règle de Schulze et Hardy, qui dit que la valeur de la concentration flocculante des électrolytes dépend uniquement de leur charge et est proportionnelle à la sixième puissance de la valence. Nous avons vu [4] que dans le cas qui nous occupe, les électrolytes n'ont pas d'action spécifique et que c'est la charge des

cations quels qu'ils soient qui permet la fixation. En ce qui concerne le rapport (1/2)⁶ dans lequel devraient se trouver les concentrations respectives des ions mono- et bivalents au moment où la fixation débute, nous n'avons pas étudié des zones de concentration suffisamment rapprochées pour donner une réponse précise, mais les rapports observés dans nos résultats donnent cependant des valeurs du même ordre de grandeur. Cette constatation justifie donc pleinement le fait d'appliquer au problème de la fixation des théories de chimie colloïdale.

Un nombre relativement restreint de théories a été établi, concernant la stabilité des colloïdes. La plus rationnelle et la plus complète, la plus attachante aussi par sa clarté, semble bien être celle de Verwey et Overbeek [6], que nous avons tenté d'appliquer à la fixation du bactériophage.

Voici, brièvement esquissé, l'essentiel de la théorie de Verwey et Overbeek. Ces auteurs considèrent que, lorsque deux particules colloïdales, agitées de mouvement brownien, arrivent au voisinage l'une de l'autre, elles sont soumises en ordre principal à deux forces opposées. La première de ces forces est une force de répulsion de nature électrique provenant de l'identité de charge des surfaces en présence. Cette force est toutefois atténuée dans une certaine mesure par l'existence au voisinage immédiat des particules d'un « gaz ionique » de signe opposé. Cette force de répulsion communique aux particules une énergie potentielle de répulsion que Verwey et Overbeek expriment par leur formule n° 56 dans le cas de deux particules identiques :

$$V_r = 1/2 \cdot \epsilon \cdot a \cdot \psi_0^2 \cdot \ln(1 + e^{-\kappa \cdot H_0}) \quad (9)$$

V_r est l'énergie potentielle de répulsion, a le rayon de la particule, ψ_0 son potentiel électrique superficiel et H_0 la plus courte distance entre deux particules. Les autres symboles ont leur signification usuelle. Cette formule tient compte, comme on le voit, non seulement du potentiel électrique (ψ_0) et de la distance entre les particules (H_0), mais encore des conditions ioniques du milieu par le facteur κ . Il est à remarquer que l'énergie de répulsion, contrairement à l'énergie coulombienne pour des charges ponctuelles, n'est jamais infinie, le terme logarithmique tendant vers la valeur limite 0,693 quand H_0 tend vers 0.

Verwey et Overbeek introduisent ensuite une force d'attraction entre les deux particules. Cette force, généralement connue sous le nom de force de London-Van der Waals, crée une énergie potentielle d'attraction cette fois, auquel Verwey et Overbeek donnent l'expression de première approximation suivante :

$$V_a = \frac{-A \cdot a}{12} \cdot \frac{1}{H_0} \quad (10)$$

A est une constante désignée sous le nom de constante de London-Van der Waals. Les autres symboles ont la même signification que dans la formule précédente. Le signe moins est introduit pour indiquer que cette énergie est de signe contraire à celle de répulsion.

Il est à remarquer, d'après la formule (10) que l'énergie d'attraction devient infinie lorsque H_0 s'annule, ce qui signifie, aux courtes distances, que l'attraction l'emporte toujours sur la répulsion qui, elle, reste finie.

Enfin, l'énergie totale d'interaction entre deux particules, V , sera évidemment donnée par la somme $V_r + V_a$ et, de l'allure de la courbe $V-H_0$, on peut déduire si les particules possèdent ou non une probabilité de contact non négligeable, étant entendu que, si le contact a lieu, il reste permanent puisque l'attraction l'emporte sur la répulsion à ce moment.

Le point le plus délicat, peut-être, de la théorie de Verwey et Overbeek semble consister à attribuer l'attraction des particules colloïdales aux forces de London-Van der Waals. En effet, depuis l'introduction de ces forces [7, 8] différents auteurs [9, 10, 11] se basant surtout sur des considérations théoriques, ont prévu l'existence d'autres types de forces d'attraction.

Quoi qu'il en soit, nous avons préféré nous en tenir à la théorie originale de Verwey et Overbeek, avec l'approximation de la formule (10). Cependant, cette théorie étant établie pour des particules identiques en charge et dimensions, et le phage et la bactérie étant nettement dissemblables à ces points de vue, nous avons dû adapter les formules de Verwey et Overbeek à notre cas par les considérations qui seront développées dans la seconde partie.

EFFETS DE LA CONGÉLATION SUR LES BACTÉRIOPHAGES

par J. PANJEL, J. HUPPERT et E. BARBU (*)
(avec la collaboration technique de M^{lle} M. M. NICOLAS).

(Institut Pasteur)

Les méthodes de congélation et de décongélation sont communément employées pour obtenir certains effets de dissociation sur divers matériels biologiques. Il ne semble pas, toutefois, qu'elles aient été systématiquement étudiées dans le cas des virus et particulièrement des bactériophages. Dans une telle étude divers facteurs doivent être pris en considération et notamment : la nature du milieu de suspension, la température et la vitesse de congélation, les conditions de décongélation, le nombre de congélations successives, la durée de la congélation, etc.

Nous avons étudié l'influence de ces facteurs sur divers bactériophages et avons constaté qu'il existait des différences marquées de sensibilité d'un type de phage à l'autre : ces différences de comportement tiennent sans doute à des particularités structurales qui pourraient, de ce fait, se trouver précisées.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1^o Le phage D4 de *S. enteritidis* a été préparé et purifié selon une méthode décrite antérieurement [7].

2^o Les phages T1, T2r et T4r ont été préparés et purifiés soit par précipitation acide selon la méthode de Herriott et Barlow [3], soit par extraction à partir de cultures sur boîtes de gélose en lyses confluentes selon Adams [4]. Les purifications sont effectuées par plusieurs centrifugations différentielles accompagnées éventuellement de traitement des suspensions par la DNase (1,5 µg/ml) et la trypsine (1,5 µg/ml).

3^o Les numérasions de phages ont été effectuées selon la méthode de Gratia (Cf. Adams [4]). Les points expérimentaux représentent la moyenne de deux ou trois comptages selon le cas. L'erreur expérimentale est inférieure à ± 15 p. 100.

(*) Manuscrit reçu le 2 avril 1957.

4° Les mesures de densité optique ont été effectuées au spectro-photomètre de Jobin et Yvon.

5° Les mesures de viscosité ont été effectuées dans un appareil de type Couette à un gradient de vitesse de $15,3 \text{ sec}^{-1}$, les concentrations en ADN (acide désoxyribonucléique) des suspensions étant toujours inférieures à $40 \mu\text{g/ml}$. Dans ces conditions, en solution saline, les valeurs du rapport $\frac{\text{viscosité spécifique}}{\text{concentration en ADN}}$ sont très proches de la valeur de la viscosité intrinsèque déduite par extrapolation à gradient et concentration nuls.

6° La quantité d'ADN libérée à partir des suspensions de phages diversement traitées peut être estimée, d'une part, d'après la densité optique à $260 \text{ m}\mu$ des surnageants de centrifugation (à $15\,000 \text{ g}$ pendant trente minutes pour T2r et T4r ; à $25\,000 \text{ g}$ pendant quarante-cinq minutes pour D4 ; à $25\,000 \text{ g}$ pendant cent vingt minutes pour T1), d'autre part, d'après la viscosité spécifique de ces surnageants. La concentration approximative en g/ml peut être obtenue en faisant le rapport entre la viscosité spécifique trouvée expérimentalement et la viscosité intrinsèque de l'ADN du phage. Cette viscosité intrinsèque est égale à $10\,000 \pm 15 \text{ p. 100}$ (concentration en g/ml) pour les ADN extraits par différentes méthodes à partir du phage D4 [2, 8].

7° Les congélations des préparations sont effectuées dans des tubes de verre à parois fines ayant un diamètre de 7 à 8 mm de façon à obtenir l'équilibre de température le plus rapide possible. Ces tubes sont immergés dans le mélange eau-alcool-glace carbonique donnant la température désirée ou dans l'azote liquide. La décongélation s'effectue en plongeant les tubes dans l'eau à la température désirée.

II. — RÉSULTATS.

1° INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE DE CONGÉLATION. — Des suspensions d'une même préparation de phage en milieu Ringer (pH 6,8 à 7) sont congelées pendant dix minutes à diverses températures puis déconglées à 23°C . On constate, d'une façon générale, que, dans ces conditions, le seul passage à l'état solide des suspensions de phages ne suffit pas à produire des effets ; il faut atteindre certaines températures, variables selon chaque phage, pour que ceux-ci se manifestent.

Les courbes A et B de la figure 1 montrent, d'une part, le pourcentage d'inactivation apprécié par numération (courbe A), d'autre part, le pourcentage d'ADN libéré apprécié par mesure de la viscosité (courbe B) dans le cas du phage D4. On constate dans ces conditions un assez bon parallélisme entre les deux courbes.

Les phages T1, T2r et T4r donnent des résultats plus difficilement interprétables. En effet, nous avons observé que le parallélisme « inactivation-libération d'ADN » n'est conservé que pour les suspensions qui ont été préalablement traitées à la trypsine (1,5 µg/ml pendant trente-six heures à 5° C, après quoi les phages sont recentrifugés et lavés pour éliminer l'enzyme) : les courbes C

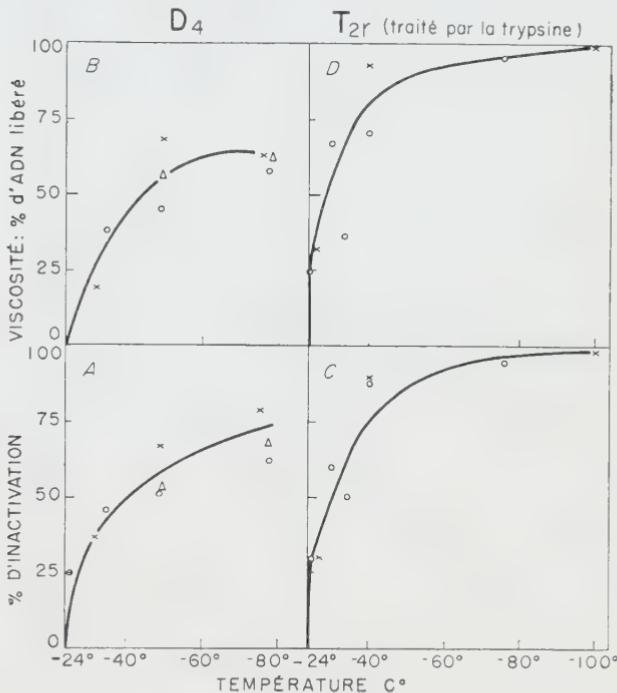


FIG. 1. — Inactivation et libération d'ADN de D4 et T2r (traité par la trypsine) après dix minutes de congélation et décongélation à 23° C (milieu Ringer). Les différents signes indiquent des séries d'expériences différentes.

et D de la figure 1 relatives à T2r ne diffèrent des courbes correspondantes de D4 que par la limite de température à laquelle commencent à se produire les effets de congélation (— 25° C pour T2r, — 30° C pour D4) et par le fait que les pourcentages d'inactivation et de libération d'ADN sont plus élevés pour T2r que pour D4.

Lorsque, au contraire, les suspensions des phages de la série T n'ont pas été soumises au traitement par la trypsine, le parallélisme « inactivation-libération d'ADN » n'est plus respecté (Cf. courbes de la fig. 2) : les pourcentages d'inactivation devien-

ment très supérieurs aux pourcentages de libération d'ADN. Ainsi, à -25°C pour T2r et T4r, à -30°C pour T1, l'inactivation avoisine 15 p. 100 sans libération d'ADN, tandis qu'à des températures inférieures (-30°C pour T2r et T4r, -50°C pour T1) les pourcentages d'inactivation atteignent plus de 60 p. 100 pour moins de 30 p. 100 d'ADN libéré.

Les résultats du traitement par la trypsine ne sont pas entière-

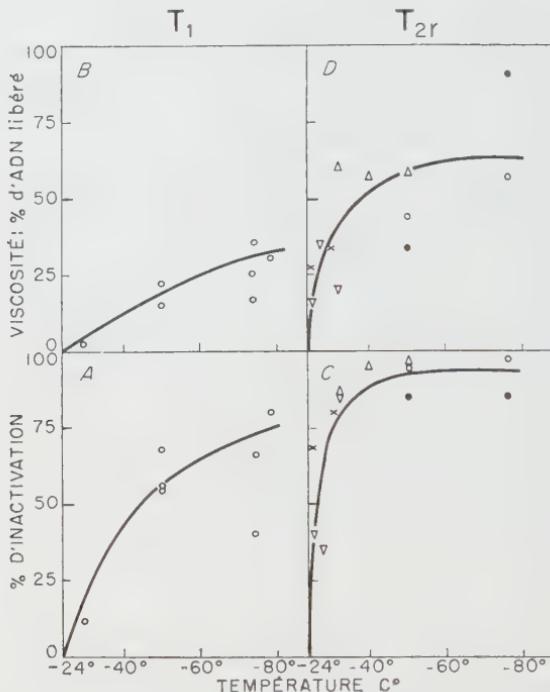


FIG. 2. — Inactivation et libération d'ADN de T1 et T2r après dix minutes de congélation et décongélation à 23°C (milieu Ringer). Les différents signes indiquent des séries d'expériences différentes.

ment inattendus : en effet, si l'on en juge par la courbe de viscosité, les milieux contenant des protéines exercent un effet protecteur très net sur les phages soumis à la congélation en ce qui concerne la libération d'ADN (*Cf. § 5*) ; on peut donc s'attendre à ce que les phages non traités par la trypsine, sans doute encore contaminés par diverses impuretés protéiques adsorbées sur leurs enveloppes, se dissocient moins aisément que les phages débarrassés de ces impuretés ; il est singulier cependant que l'inacti-

vation proprement dite ne soit pas modifiée et l'on pourrait de ce fait considérer, soit que les protéines adsorbées ont pour effet d'empêcher la libération de l'ADN, soit qu'il se produit certaines interactions entre ces protéines et l'ADN, interactions se traduisant par une forte diminution de la viscosité spécifique.

2° INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE DE DÉCONGÉLATION. — Les conditions de décongélation jouent un rôle important dans tous ces phénomènes. Ainsi, avec D4 en milieu Ringer, les pourcen-

TABLEAU I.

| Décongélation | 23°C | 37°C |
|------------------|------|------|
| % d'inactivation | 60 % | 35 % |
| % d'ADN libéré | 34 % | 26 % |

tages d'inactivation et de libération d'ADN sont plus importants lorsque la décongélation est effectuée à 23°C, comme ci-dessus, que lorsqu'elle est effectuée à 37°C. Le tableau I indique les

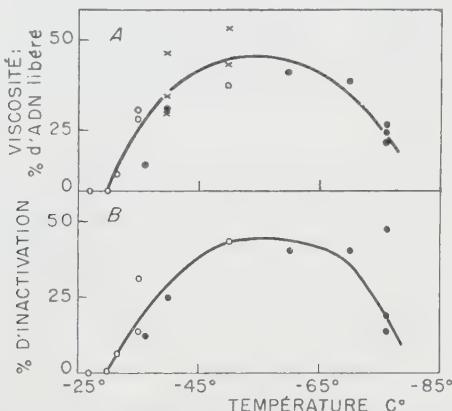


FIG. 3. — Inactivation et libération d'ADN de D4 après dix minutes de congélation et décongélation à 2°C. Les différents signes indiquent des séries d'expériences différentes.

résultats obtenus pour une préparation congelée cinq minutes à -74°C.

Lorsque la décongélation est effectuée à 2°C, les résultats prennent un aspect très différent de ceux obtenus par décongélation à 23°C. Comme on le voit sur les courbes de la figure 3,

l'efficacité des traitements par congélation passe alors par un maximum correspondant à une température voisine de -50°C . La diminution des pourcentages observés à -76°C ne signifie pas que l'inefficacité relative de la congélation se maintienne à des températures inférieures, puisqu'on retrouve à -105°C des pourcentages d'inactivation et de libération d'ADN de l'ordre de 60 p. 100 et dans l'azote liquide des pourcentages atteignant 65 p. 100. Au surplus, on est en droit de penser que les pourcentages d'environ 20 p. 100 observés à -76°C dans nos conditions d'expérience sont encore au-dessus de la réalité : en effet, dans les tubes de verre utilisés l'équilibre de température met une à deux minutes pour s'établir ; si l'on y substitue des tubes capillaires afin de diminuer ce délai, on peut réduire les pourcentages d'inactivation et d'ADN libéré à moins de 10 p. 100.

Il y a donc, pour un phage déterminé, des zones de tempéra-

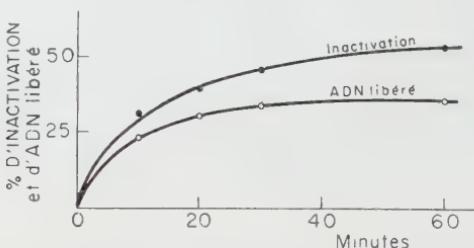


FIG. 4. — Influence du temps de congélation sur D4 (congélation à -35°C en Ringer ; décongélation à 2°C).

ture de congélation efficace qui peuvent varier selon la température de décongélation : ainsi pour D4, la zone de température efficace est comprise entre -30°C et une température certainement inférieure à -70°C lorsqu'on décongèle à 23°C , alors qu'elle est certainement comprise entre -30°C et une température supérieure à -76°C lorsqu'on décongèle à 2°C .

3^o INFLUENCE DE LA DURÉE DU SÉJOUR A L'ÉTAT CONGELÉ. — Les résultats précédemment obtenus montrent que pour un séjour à l'état congelé de dix minutes, on peut obtenir dans la zone de températures voisines des limites d'efficacité l'inactivation d'une certaine proportion de phages sans libération de leurs ADN. Ceci est contraire à ce qui se passe dans d'autres conditions, dans lesquelles les deux effets de la congélation : inactivation et libération d'ADN, sont parallèles. Nous avons étudié l'effet du temps de séjour à l'état congelé sur l'inactivation et sur la libération des ADN des phages. La figure 4 montre que, pour le phage D4, la libération d'ADN augmente rapidement pendant les dix pre-

mières minutes puis devient très lente et atteint bientôt un plateau. Au contraire, le pourcentage d'inactivation, qui s'est accru rapidement pendant les dix premières minutes, continue à augmenter ensuite de façon non négligeable : ainsi, à -35°C , il augmente de plus de 10 p. 100, de trente minutes à soixante minutes, alors que la quantité d'ADN libérée n'a pas changé.

On peut même obtenir des pourcentages d'inactivation croissant au fur et à mesure que se prolonge le séjour à l'état congelé en utilisant des températures auxquelles l'effet de libération d'ADN devient pratiquement négligeable. Le tableau II indique les résultats obtenus avec les phages D4 ($4 \cdot 10^{11}/\text{ml}$) et T2r traité par la trypsine ($1,9 \cdot 10^{11}/\text{ml}$), conservés à -14°C en milieu Ringer.

TABLEAU II.

| Temps | D4 | | | | | T2r | | | |
|-------------------------|---|-----|-----|------|-----|-------|-------|-----|-----|
| | 60 mn | 4h. | 8h. | 24h. | 8j. | 60 mn | 22h. | 4j. | 9j. |
| Inactivation | 10% | 11% | 16% | 21% | 24% | 9% | 12,7% | 30% | 54% |
| Libération d' A.D.N. | inférieure à la limite de sensibilité du viscosimètre | | | | | | | | |

Ces diverses expériences montrent donc que, dans certaines conditions, les deux effets, inactivation avec libération d'ADN ou inactivation sans libération d'ADN, sont indépendants, cette indépendance étant d'autant plus marquée qu'on se rapproche davantage des limites de température efficace et que le temps de séjour est plus long.

4° INFLUENCE DES VARIATIONS DE TEMPÉRATURE SUR LES PHAGES A L'ÉTAT CONGELÉ. — Nous avons entrepris une série d'expériences pour vérifier si les phages à l'état congelé étaient encore sensibles aux variations de température. Ainsi une préparation de D4, congelée vingt minutes à -20°C puis portée directement et toujours à l'état solide, à -76°C pendant dix minutes et enfin décongelée à $+2^{\circ}\text{C}$, donne un pourcentage d'inactivation et de libération d'ADN de 40 à 50 p. 100. Le résultat est le même si l'on fait suivre la congélation à -76°C d'un séjour de trente minutes à -10° ou -20°C avant la décongélation à $+2^{\circ}\text{C}$.

Ce résultat est très différent de ceux qu'on obtient lorsque les traitements comportent une décongélation intermédiaire : ainsi une même préparation congelée une première fois cinq minutes à -20°C , puis décongelée à $+2^{\circ}\text{C}$, puis recongelée à -76°C et décongelée enfin à 2°C ne subira qu'une inactivation d'environ 20 p. 100, c'est-à-dire le même pourcentage que par une congélation unique à -76°C .

Il apparaît donc que, même à l'état congelé, les phages restent encore très sensibles aux variations de température.

5° INFLUENCE DU MILIEU. — La composition du milieu de suspension joue un rôle considérable dans les phénomènes de congélation. Nous ne ferons qu'indiquer ici un certain nombre de faits mis en évidence dans des conditions de milieu où les phages étudiés sont par ailleurs parfaitement stables lorsque les températures varient de 0° C à +37° C.

a) Rôle protecteur du bouillon : avec les phages de la série T, les pourcentages d'inactivation, qui varient de 60 à 80 p. 100 entre — 50° et — 76° C en milieu Ringer, sont très nettement diminués lorsque les suspensions sont effectuées en bouillon : moins de 50 p. 100 pour dix minutes à — 76° C pour T4r, moins de 30 p. 100 pour T1 et T2r dans les mêmes conditions. Il existe même des phages tels que T5 qui, après 5 congélations à — 76° en bouillon Disco, n'ont pratiquement subi aucune inactivation.

b) Rôle protecteur de la glycérine : la glycérine, dont le rôle protecteur est bien connu depuis les travaux de Lovelock [5], joue ici aussi un rôle analogue ; dans le cas de D4, le pourcentage d'inactivation à — 50° qui est de 55 p. 100 en milieu Ringer n'atteint pas 5 p. 100 lorsqu'on emploie ce même milieu additionné à 5 p. 100 de glycérine.

c) Les effets de la congélation, au moins dans certaines limites, s'accroissent avec la concentration saline du milieu de suspension. C'est ainsi que les pourcentages de libération d'ADN de D4 sont deux à trois fois plus faibles lorsque le Ringer est dilué cent fois dans l'eau bidistillée. Ils s'accroissent par contre notablement en NaCl molaire où ils atteignent près de 80 p. 100 pour une congélation et plus de 90 p. 100 pour trois congélations successives.

Un tel résultat n'est pas pour nous surprendre si l'on admet avec Meryman [6] que les effets de déshydratation sont prépondérants au cours de la congélation.

d) Les pH alcalins (tampon carbonate-bicarbonate pH 10,2), auxquels les phages sont parfaitement conservés à température ambiante, permettent même d'obtenir des pourcentages voisins de 99 p. 100 après une seule congélation.

6° CAS DES CONGÉLATIONS SUCCESSIVES. — Plusieurs congélations et décongélations successives, effectuées sur un même échantillon dans les zones de température efficace, augmentent progressivement les pourcentages d'inactivation et d'ADN libéré. On peut ainsi obtenir, dans le cas de phages comme T1, T2r et T4r en milieu Ringer, des pourcentages de l'ordre de 98 p. 100. D'autre part, la multiplication des opérations de congélation sans décon-

gération intermédiaire constitue également un moyen de dissociation très efficace.

Ainsi, avec un phage tel que Fcz actif sur *E. coli* Fb, le pourcentage d'inactivation après une ou plusieurs congélations à des températures variant de -20° C à -200° C , suivies de décongélation intermédiaires à 23° C , n'atteint pas 25 p. 100, tandis qu'en faisant varier la température à l'état congelé (par exemple de -200° C à -20° C , puis -50° C , puis -76° C) le pourcentage d'inactivation dépasse 75 p. 100.

III. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Les résultats de nos expériences montrent que la congération et la décongélation des suspensions de phages provoquent l'inactivation accompagnée ou non de libération d'ADN.

En ce qui concerne les mécanismes intimes de ces phénomènes nous en sommes réduits aux hypothèses. D'une façon générale, d'ailleurs, les effets de la congération sur les cellules vivantes et les tissus ne commencent à être étudiés que depuis quelques années. Les travaux de Luyet ont montré l'importance des phénomènes de vitrification et la distinction qu'il convient d'établir entre « congération lente » et « congération rapide ». En fait, comme l'a indiqué Meryman [6], il semble que tous les phénomènes observés puissent s'expliquer par le phénomène essentiel : l'eau, déplacée de ses solutions, passe à l'état solide et se comporte alors comme un matériel biologiquement inerte. Aussi bien, les modifications intervenues au cours des expériences comportant des variations de température à l'état congelé pourraient s'expliquer par le changement de taille des cristaux de glace au cours de ces traitements.

Mais il convient également de ne pas perdre de vue les effets osmotiques, d'ailleurs communs à tous les types de congération. En outre, les phénomènes de déshydratation jouent très certainement un rôle prépondérant dans l'inactivation des phages par congération.

Ces considérations amènent à s'interroger sur la signification des limites de température efficace mises en évidence pour les différents phages et à se demander si celles-ci présentent une valeur caractéristique du même ordre que les limites de température efficace étudiées par Lark et Adams [4] dans leurs expériences de chauffage.

De plus, nous avons vu qu'il peut exister ou non un parallélisme entre l'inactivation proprement dite (déterminée par numération) et la libération d'ADN (déterminée par viscosité). Il est même possible d'obtenir par congération une inactivation sans libération d'ADN. Il semblerait donc que la congération peut

causer divers types de lésions, se traduisant par des effets plus ou moins graves sur les divers constituants structuraux.

D'un autre point de vue, on peut remarquer que l'étude systématique de la congélation entreprise sur le phage attire l'attention sur les précautions qui s'imposent dans la conservation des virus à l'état congelé : les premières expériences entreprises par l'un d'entre nous confirment ces conceptions.

Enfin, les méthodes de congélation-décongélation permettent de contrôler les conditions d'extraction des acides nucléiques des phages et, à cet égard, pourraient être étendues avec fruit à d'autres types de virus, notamment en liant ces expériences à une étude au microscope électronique, susceptible de nous renseigner sur la valeur morphologique des constituants.

RÉSUMÉ.

L'étude entreprise sur les phages T1, T2r, T4r, actifs sur *E. coli* B et D4 actif sur *S. enteritidis*, montre qu'à partir d'une certaine température variable selon les types de phages, la congélation produit essentiellement deux effets : inactivation et libération d'ADN. Ces deux effets sont généralement parallèles, mais on peut, notamment dans la zone voisine des limites de température efficace, obtenir une inactivation sans libération d'ADN.

L'influence du temps de séjour à l'état solide, de la décongélation, du milieu et des variations de température à l'état solide est étudiée. Le mécanisme de ces phénomènes est discuté.

SUMMARY

EFFECT OF FREEZING ON BACTERIOPHAGES.

The effect of freezing the phages T1, T2r and T4r, all active on *E. coli* B and D4 active on *S. enteritidis* has been studied. Below a certain temperature which varied according to the phage, two main effects were observed : inactivation of phage and liberation of DNA. The two effects generally ran parallel, but within a narrow temperature range just above that producing both effects, inactivation occurred without release of DNA. The effects of variations of temperature while in the solid state, the length of time spent in this state and the effects of thawing were also studied. Possible causes of these phenomena are discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADAMS (R. H.). In *Methods in medical Research*, 1950, **2**, 1.
- [2] BARBU (E.), BASSET (J.), JOLY (M.) et WAHL (R.). *J. Polymer Sci.*, 1957, **23**, 717.

- [3] HERRIOTT (R. M.) et BARLOW (J. L.). *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 17.
- [4] LARK (K. G.) et ADAMS (R. H.). *Cold Spring Harbor quant. Symp.*, 1953, **18**, 171.
- [5] LOELOCK (J. E.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 414.
- [6] MERYMAN (H. T.). *Science*, 1946, **124**, 525.
- [7] WAHL (R.), LEE (K. Y.) et BARBU (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 153.
- [8] WAHL (R.), JOLY (M.) et BARBU (E.). *Trans. Faraday Soc.*, 1957, **53**, 249.

ANALYSE DE LA DESCENDANCE DE ZYGOTES
FORMÉS PAR CONJUGAISON
CHEZ *ESCHERICHIA COLI* K 12

par Thomas F. ANDERSON (*) et René MAZÉ (**).

(Institut Pasteur. Service de Physiologie microbienne)

Dans un croisement entre bactéries Hfr H et F⁻, mélangées en quantités égales, la conjugaison intéresse pratiquement la totalité des bactéries [1]. Un segment chromosomique OR des bactéries Hfr pénètre progressivement dans les bactéries F⁻ par son extrémité O, l'ordre et la position relative des caractères génétiques situés sur ce segment pouvant être définis par le temps auquel ils pénètrent dans la bactérie F⁻ [2], ainsi qu'il est indiqué sur le tableau. Après transfert de tout ou partie du segment chromosomique OR de bactérie Hfr à bactérie F⁻, celle-ci joue le rôle d'un zygote incomplet dans lequel s'accomplit la recombinaison génétique. Afin de préciser certaines des étapes de ce processus de conjugaison et de recombinaison, nous avons observé au microscope des bactéries en voie de conjugaison et les produits de celle-ci.

I. — *La conjugaison.*

Des bactéries Hfr H et P678 (les deux souches ont été réisolées à partir d'une seule bactérie) sont mélangées en bouillon [2] à parties égales. A intervalles de temps variables, des échantillons sont examinés au microscope. Il est relativement aisé de distinguer les bactéries des deux types : les bactéries Hfr sont courtes et mobiles, les bactéries F⁻ plus longues et immobiles. De nombreux couples sont visibles, les bactéries F⁻ étant traînées dans le milieu par les bactéries Hfr. La nature de l'union entre ces bactéries n'est pas discernable au microscope optique, mais a été examinée au microscope électronique [3]. Ce contact peut être plus ou moins étroit, certaines bactéries Hfr semblant unies à des

(*) Fulbright research scholar and fellow of the John Simon Guggenheim Memorial Foundation. Adresse permanente : Johnson Foundation, University of Pennsylvania Hospital, Philadelphia (U. S. A.).

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 4 avril 1957.

bactéries F- par des fibres invisibles. On peut assister sous le microscope à la formation de tels couples. Dans certains cas, un contact transitoire s'établit qui se rompt très rapidement.

II. — *Examen de couples isolés.*

Des couples de bactéries en voie de conjugaison ont été placés dans des gouttelettes de bouillon, en chambre à huile, à 37°, en utilisant l'appareil de micromanipulation et les techniques de de Fonbrune [4]. Les bactéries restent souvent accolées d'une à deux heures. Après séparation, on peut distribuer les ex-conjugants dans des gouttes différentes et vérifier, après croissance, que l'ex-conjugant Hfr ne donne jamais naissance qu'à des bactéries ayant le génotype du parent Hfr, alors que l'ex-conjugant F- donne naissance à des bactéries ayant le génotype du parent F- et à des recombinants. C'est donc bien l'ex-conjugant F- qui constitue le zygote comme l'a démontré Hayes [5]. Dans quelques cas, l'ex-conjugant Hfr ne s'est plus divisé après séparation. Dans un cas, c'est l'ex-conjugant F- qui ne s'est plus divisé.

III. — *Analyse de la descendance du zygote.*

La descendance de 18 couples a été analysée, après isolement au micromanipulateur des bactéries provenant de la division du zygote. A chaque division, et ceci pendant autant de générations que cela est possible (de 8 à 12), les bactéries filles sont placées dans des gouttelettes de bouillon. Les bactéries qui ont été ainsi isolées sont laissées ensuite toute la nuit pendant laquelle elles forment des clones de 1 000 à 10 000 bactéries. Ces clones sont transférés dans des petits tubes de bouillon et, après croissance, leurs caractères génétiques sont analysés. Une étude analogue a déjà été faite par Lederberg [6].

Contrairement à ce que l'on observe lorsque l'on suit dans les mêmes conditions la division d'une bactérie F- normale, la division d'un zygote se fait d'une manière irrégulière et donne naissance à une proportion non négligeable de bactéries incapables de se diviser. Ceci est vrai, que l'on observe ou non des recombinants dans la descendance. Un exemple caractéristique est illustré par la figure. Fréquemment, le zygote s'allonge sans se diviser, puis se divise irrégulièrement, l'un des descendants, ou plusieurs, conservant un volume supérieur à celui des bactéries normales. Parmi les 18 lignées ainsi analysées, 7 étaient constituées uniquement de bactéries ayant le génotype du parent F-. Leur formation a cependant présenté les caractères décrits ci-dessus (divisions irrégulières, formation de bactéries non viables). Les 11 autres lignées contenaient des recombinants.

Aucun de ces recombinants ne possédait de caractère du parent Hfr situés en dehors du segment OR [2] tels que Sm^s ou Xyl⁺. Les types de recombinants obtenus sont présentés dans le tableau. A l'exception de deux lignées qui ne contenaient chacune qu'un seul type de recombinants, toutes les autres en contenaient plus d'un. La moyenne, pour l'ensemble des 11 lignées, est de 2,4 types. Deux d'entre elles en renfermaient 4. Parmi les clones

PEDIGREE 6
26 XII 56

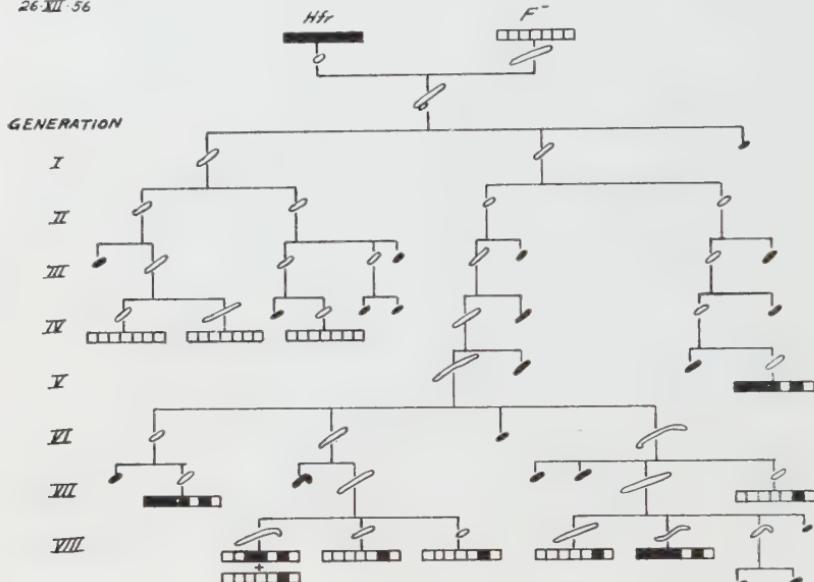


FIG. 1. — *Descendance d'un couple après conjugaison.* — On a représenté la taille relative et la forme approximative des bactéries, leur viabilité (bactéries non viables en noir) et la constitution génétique des clones. Les caractères génétiques sont représentés par des petits carrés (de gauche à droite T, L, Az, T₁, Lac, Gal, Sm) clairs, s'ils sont issus du parent F-, sombres s'ils proviennent du parent Hfr.

Noter que celui-ci ne s'est plus divisé après conjugaison.

issus des premiers ségrégants, on trouve fréquemment des clones purs ayant le génotype du parent F-, mais jamais de clones purs de recombinants. Ce n'est qu'à partir de la cinquième génération, comme dans la lignée représentée sur la figure, que de tels clones commencent à apparaître. Dans un cas, une bactérie de la dixième génération a donné un clone mixte contenant, outre le génotype du parent F-, des recombinants ayant les génotypes désignés par les lettres B, D et H dans le tableau.

Dans plusieurs, telle que celle qui est représentée sur la figure,

il semble que plusieurs recombinaisons successives se soient produites.

Les faits principaux qui ressortent de cette étude préliminaire sont les suivants :

1° La conjugaison a pour conséquence le transfert de matériel génétique du parent Hfr au F-;

2° La division d'un zygote ainsi constitué et de certains de ses descendants est irrégulière ;

3° Beaucoup de descendants ne sont pas viables ;

4° La ségrégation de clones purs de recombinants est relativement tardive :

Types de recombinants observés.

| Caractères* | T ⁺ | L ⁺ | Az ^s | T ₁ ^s | Lac ⁺ | Gal _b ⁺ | Sm ^s | Xyl ⁺ | Nombre de lignées donnant ce type |
|--|----------------|----------------|-----------------|-----------------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|-----------------------------------|
| Temps minimum de pénétration (en minutes) | 8 | 8 1/2 | 9 | 11 | 18 | 25 | - | - | |
| Recombinants | | | | | | | | | |
| A | + | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| B | + | + | - | - | - | - | - | - | 4 |
| C | + | + | + | - | - | - | - | - | 2 |
| D | + | + | + | + | - | - | - | - | 8 |
| E | + | + | + | + | + | - | - | - | 0 |
| F | + | + | + | + | + | + | - | - | 1 |
| G | - | - | + | - | - | - | - | - | 1 |
| H | - | - | + | + | - | - | - | - | 2 |
| I | - | - | + | + | + | - | - | - | 1 |
| J | - | - | - | + | - | - | - | - | 1 |
| K | - | - | - | - | - | + | - | - | 2 |
| L | + | + | - | + | + | - | - | - | 1 |
| M | + | + | + | + | - | + | - | - | 3 |
| N | - | - | + | + | - | + | - | - | 1 |
| Fréquence des caractères | 20 | 19 | 19 | 18 | 3 | 7 | 0 | 0 | |
| Fréquence des "crossing-over" entre ces caractères | 1 | 10 | 5 | 15 | 8 | | | | |

(*) Pouvoir (+) de synthétiser la thréonine (T), la leucine (L), utilisation (+) du lactose (Lac), du galactose (Gal_b), du xylose (Xyl). Sensibilité (s) au nitrate de sodium (Az), au phage T₁, à la streptomycine (Sm).

5° Un même zygote semble pouvoir former plus d'un type de recombinant.

Il semble prématué de tirer de l'analyse des descendants d'un zygote des conclusions quant au mécanisme de la recombinaison génétique au niveau chromosomique. D'une part, la bactérie F- réceptrice contient plus d'un noyau. D'autre part, la division de ces noyaux n'est probablement pas synchrone. Enfin, la formation fréquente de bactéries non viables complique encore l'analyse. Il semble, cependant, que la recombinaison se produise en une série d'événements indépendants. Si différents types de recombinants apparaissent dans une même lignée, il est peu probable que ce soit la conséquence de la pénétration, dans une même bactérie F-, de plusieurs fragments chromosomiques différents du parent Hfr. Il semble plus vraisemblable qu'un seul fragment ait été transféré, mais que ce fragment soit susceptible de participer à plusieurs événements-recombinaison, par exemple par la formation successive de « répliques » segmentaires.

SUMMARY

ANALYSIS OF PEDIGREE IN *E. coli* K12.

Conjugation between Hfr H and F- bacteria of the K12 strain of *Escherichia coli* has been observed under the light microscope. Mating pairs were isolated with a micromanipulator and pedigrees of the ex-conjugants were followed. Recombinants are found exclusively in the descendants of the F- ex-conjugant (zygote). Division of the zygote is irregular. Among the cells which appear in its progeny many are non viable. Pure clones of recombinants do not occur until the fifth generation. Several types of recombinants are usually found in the progeny of a single zygote.

★★

Ce travail a été encouragé et aidé par les suggestions et les discussions critiques de MM. A. Lwoff, F. Jacob et E. L. Wollman, auxquels nous tenons à exprimer notre gratitude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2566.
- [2] WOLLMAN (E. L.) et JACOB (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2449.
- [3] ANDERSON (T. F.), WOLLMAN (E. L.) et JACOB (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957 (sous presse).
- [4] FONBRUNE (P. DE). *Technique de micromanipulation*. Masson, édit., Paris, 1949.
- [5] HAYES (W.). *Cold Spring Harb. Symp.*, 1953, **18**, 75.
- [6] LEDERBERG (J.). *J. Bact.*, 1956, **71**, 497.

ANALYSE DE L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE MUTANTS AUXOTROPHES D'ESCHERICHIA COLI EXIGEANT L'HOMOSÉRINE, PAR L'ACIDE ALPHA-AMINO-DELTA-HYDROXYVALÉRIANIQUE

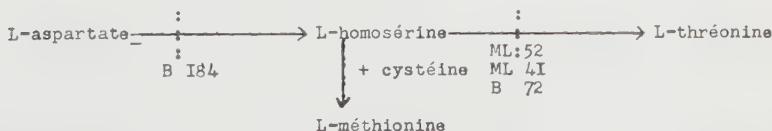
par M^{me} Marie-Louise HIRSCH (*)

(Centre National de la Recherche Scientifique,
Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institut Pasteur, Garches)

Shive [4] a décrit en 1950 une méthode permettant d'analyser le mécanisme d'action des antimétabolites sur la croissance bactérienne. Il considère qu'en présence du produit de la réaction inhibée par l'antimétabolite, ce dernier ne doit plus inhiber la croissance. De plus, en présence de substances exerçant un « effet d'épargne » (sparing effect) sur le produit de la réaction enzymatique inhibée, l'index d'inhibition [2] doit augmenter. Enfin, si la lésion métabolique induite par l'analogique est préexistante dans l'organisme considéré (c'est-à-dire s'il s'agit d'un mutant chez lequel l'enzyme inhibé par l'antimétabolite est absent), l'analogique doit être sans action, le produit de la réaction inhibée devant être fourni préformé à l'organisme (Cf. Woods [3]).

Dans ce mémoire, nous avons essayé d'appliquer cette méthode à l'étude de la biosynthèse de la thréonine, amino-acide dont on sait précisément, par des méthodes directes, qu'il dérive de l'homosérine chez *Neurospora crassa* [4], chez *Bacillus subtilis* [5] et chez *Escherichia coli* [6, 7, 8, 9]. Cette analyse a été entreprise dans le but de vérifier si la méthode préconisée par Shive permettait de retrouver un résultat que l'on connaissait à l'avance.

Le schéma simplifié suivant indique les relations qui existent entre les amino-acides qui dérivent de l'acide aspartique.

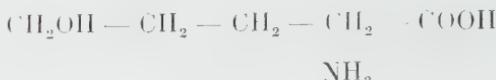


(*) Manuscrit reçu le 15 mars 1957.

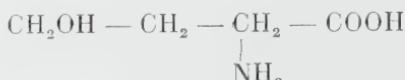
L'antimétabolite qui a été choisi pour cette étude est l'acide *a*-amino- δ -hydroxyvalérianique (que l'on appellera *pentasépine* pour simplifier l'exposé).

Les formules de la pentasépine, de l'homosépine et de la thréonine sont rappelées ci-dessous :

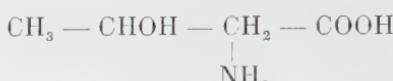
Pentasépine :



Homosépine :



Thréonine :



MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

PRODUITS UTILISÉS. — Voir Cohen et Hirsch [10]. La *D,L*-pentasépine est un don du Dr R. Gaudry, de l'Université Laval (Québec). Nous le remercions tout particulièrement.

SOUCHE UTILISÉE. — Les souches sauvages et mutantes utilisées ont déjà été décrites [7, 10].

MESURE DE LA CROISSANCE BACTÉRIENNE. — Voir Hirsch et Cohen [11].

MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DU SYSTÈME DE BIOSYNTHÈSE DE LA THRÉONINE. — Le système employé a été décrit précédemment pour les suspensions bactériennes [7] et pour les extraits enzymatiques [8].

DOSAGE MICROBIOLOGIQUE. — Le dosage microbiologique de la thréonine formée a été décrit également [7]. On verra, dans le texte, que le dosage est valable en présence de pentasépine.

RÉSULTATS

I. — EFFET DE LA PENTASÉpine SUR LA CROISSANCE D'*E. coli*.

1^o EFFET DE LA PENTASÉpine SUR LA CROISSANCE DES SOUCHEs SAUVAGEs D'*E. coli*. — La *D,L*-pentasépine n'exerce aucun effet inhibiteur sur la croissance des souches, type sauvage, ML, W,

B et K 12, même à la concentration finale de 10^{-2} M (concentration de l'isomère L).

2^o EFFET DE LA PENTASÉRINE SUR LA CROISSANCE DU MUTANT B 184, EXIGEANT SOIT L'HOMOSÉRINE, SOIT LA THRÉONINE ET LA MÉTHIONINE.
— Les résultats du tableau I montrent que la pentaséchine inhibe compétitivement la croissance du mutant B 184 sur homosérine.

TABLEAU I. — Inhibition de la croissance du mutant B 184 par la pentasérine.

| L - homosérine (M) | DL - pentasérine (concentration de l'isomère L) (M) | Unités de croissance Menier (M) |
|-----------------------|--|---------------------------------------|
| $2,5 \times 10^{-5}$ | 0 | 20 |
| $2,5 \times 10^{-5}$ | 5×10^{-5} | 14 |
| $2,5 \times 10^{-5}$ | $1,25 \times 10^{-4}$ | 5 |
| $2,5 \times 10^{-5}$ | $2,5 \times 10^{-4}$ | 0 |
| 5×10^{-5} | 0 | 44 |
| 5×10^{-5} | 5×10^{-5} | 41 |
| 5×10^{-5} | $1,25 \times 10^{-4}$ | 30 |
| 5×10^{-5} | $2,5 \times 10^{-4}$ | 23 |
| 5×10^{-5} | 5×10^{-4} | 7 |
| 5×10^{-5} | 10^{-3} | 1 |
| 10^{-4} | 0 | 65 |
| 10^{-4} | $2,5 \times 10^{-4}$ | 64 |
| 10^{-4} | 5×10^{-4} | 59 |
| 10^{-4} | 10^{-3} | 40 |
| 10^{-4} | $2,5 \times 10^{-3}$ | 1 |
| $2,5 \times 10^{-4}$ | 0 | 77 |
| $2,5 \times 10^{-4}$ | $2,5 \times 10^{-3}$ | 75 |
| $2,5 \times 10^{-4}$ | 5×10^{-3} | 36 |
| $2,5 \times 10^{-4}$ | 10^{-2} | 3 |

Temps d'incubation : 19 heures. Température : 37° C.

Si la croissance du mutant B 184 a lieu, non plus sur homosérine, mais sur le mélange thréonine-méthionine, elle devient absolument insensible à la présence de l'homologue supérieur de l'homosérine, même à des concentrations très élevées, comme en témoigne l'expérience représentée sur le tableau II.

Dans le cas de la croissance du mutant B 184 sur homosérine, l'inhibition par de faibles quantités d'analogue peut être partiellement supprimée par la thréonine ou par la méthionine ; si l'on utilise des quantités élevées d'analogue, l'addition simultanée de thréonine et de méthionine devient nécessaire pour rétablir la croissance. Tout se passe donc comme si la pentasérine inhibait les synthèses de la thréonine ou de la méthionine à partir d'homosérine.

Comme d'autre part la méthionine exerce une action inhibitrice propre sur la croissance du mutant B 184 sur homosérine, il n'est

TABLEAU II.

Insensibilité du mutant B 184 à la présence de pentaséroline
Croissance sur thréonine + méthionine).

| DL - thréonine: | | DL-pentaséroline: | | Unités |
|---|------------------|---|----------------------|-----------------------|
| L-homoséroline: (concentration de l'isomère L): | | L-méthionine: (concentration de l'isomère L): | | de croissance Meunier |
| (M) | (M) | (M) | (M) | |
| 5 x 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | - | 53 |
| 5 x 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻² | 51 |
| 5 x 10 ⁻⁵ | - | - | - | 51 |
| 5 x 10 ⁻⁵ | - | - | 5 x 10 ⁻⁴ | 7 |

Temps d'incubation : 18 heures. Température : 37° C.

pas possible d'établir avec certitude le caractère compétitif de chacune des deux suppressions de l'inhibition. L'étude de l'effet de la pentaséroline sur les mutants B 123 et B 150 permettra d'examiner séparément l'effet de l'analogique sur les synthèses respectives de la thréonine et de la méthionine.

Rappelons que Teas, chez *B. subtilis* [5] et Hirsch et Cohen chez *E. coli* [11] ont montré l'existence de mutants du type de ceux que nous allons décrire (B 123 et B 150). Ces mutants sont particulièrement intéressants pour l'analyse du phénomène étudié.

3^o EFFET DE LA PENTASÉROLINE SUR LA CROISSANCE DU MUTANT B 123, EXIGEANT SOIT L'HOMOSÉROLINE PLUS LA THRÉONINE, SOIT LA THRÉONINE PLUS LA MÉTHIONINE. — La pentaséroline inhibe la croissance du mutant B 123 sur [homoséroline + thréonine], mais non la croissance de ce mutant sur [thréonine + méthionine] (tableau III).

TABLEAU III. — Effet de la pentaséroline sur la croissance du mutant B 123.

| DL - thréonine: | | DL-homoséroline: | | DL-pentahomoséroline: | Unités |
|---------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| (concentration de l'isomère L): | | (concentration de l'isomère L): | | (concentration de l'isomère L): | de croissance Meunier |
| (M) | (M) | (M) | (M) | (M) | |
| 5 x 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | - | - | - | 46 |
| 5 x 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | - | 10 ⁻² | 44 | |
| 5 x 10 ⁻⁵ | - | 5 x 10 ⁻⁵ | | | 58 |
| 5 x 10 ⁻⁵ | - | 5 x 10 ⁻⁵ | 2,5 x 10 ⁻³ | | 36 |
| 5 x 10 ⁻⁵ | - | 5 x 10 ⁻⁵ | 5 x 10 ⁻³ | | 7 |

Temps d'incubation : 18 heures. Température : 37° C.

Il semblerait donc que ce soit la synthèse de la méthionine qui soit inhibée par la pentasérine chez ce mutant auquel la thréonine doit toujours être fournie préformée.

4° EFFET DE LA PENTASÉRINE SUR LE MUTANT B 150 EXIGEANT SOIT L'HOMOSÉRINE PLUS LA THRÉONINE, SOIT L'HOMOSÉRINE PLUS LA MÉTHIONINE, SOIT LA THRÉONINE PLUS LA MÉTHIONINE POUR SA CROISSANCE. — La seule combinaison de facteurs de croissance pour laquelle la croissance soit *insensible* à la pentasérine est celle qui se compose de thréonine plus méthionine (tableau IV), ce qui s'interpréterait de la même façon que pour le mutant B 184.

TABLEAU IV. — Effet de la pentasérine sur la croissance du mutant B 150.

| DL - thréonine : | L - méthionine : | L - homosérine : | DL - pentasé- rine : | Unités de croissance |
|-----------------------------------|------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| [concentration de l'isomère L] | | | [concentration de l'isomère L] | Meunier |
| (M) | (M) | (M) | (M) | |
| 5 x 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | | | 35 |
| 5 x 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | | 5 x 10 ⁻³ | 44 |
| 5 x 10 ⁻⁵ | | 5 x 10 ⁻⁵ | | 53 |
| 5 x 10 ⁻⁵ | | 5 x 10 ⁻⁵ | 1,25 x 10 ⁻³ | 4 |
| | 10 ⁻⁵ | 5 x 10 ⁻⁵ | | 37 |
| | 10 ⁻⁵ | 5 x 10 ⁻⁵ | | 7 |
| | 10 ⁻⁵ | 5 x 10 ⁻⁵ | 5 x 10 ⁻³ | 0 |

Temps d'incubation : 31 heures. Température : 37° C.

5° EFFET DE LA PENTASÉRINE SUR LA CROISSANCE DES MUTANTS ML 52, ML 41 ET B 72 EXIGEANT LA THRÉONINE A L'EXCLUSION DE L'HOMOSÉRINE POUR LEUR CROISSANCE. — La croissance des trois mutants ML 52, ML 41 et B 72 est absolument *insensible* à l'action de la pentasérine. Les expériences résumées dans le tableau V montrent que le rapport des concentrations pentasérine/thréonine peut atteindre la valeur de 500 sans que la croissance de ML 52 soit inhibée (1).

Ici, la lésion apparemment provoquée par la pentasérine existe, et l'on s'attend effectivement à ce que la pentasérine ne soit pas inhibitrice.

(1) *Remarque* : Puisque la croissance du mutant ML 52 est insensible aux concentrations élevées de pentasérine, cet organisme pourra être utilisé, dans ce qui suit, pour des dosages microbiologiques de la thréonine synthétisée en présence de pentasérine.

TABLEAU V. — Insensibilité des mutants ML 52, ML 41 et B 72 à la présence de la pentasérine.

| Mutants | : DL - thréonine (concentration de l'isomère L) (M) | : DL - pentasérine (concentration de l'isomère L) (M) | Unités de croissance Meunier |
|---------|--|--|------------------------------------|
| ML 52 | 2×10^{-5} | 0 | 40 |
| | 2×10^{-5} | 10^{-2} | 41 |
| ML 41 | 5×10^{-5} | 0 | 71 |
| | 5×10^{-5} | 10^{-2} | 75 |
| B 72 | 5×10^{-5} | 0 | 44 |
| | 5×10^{-5} | 10^{-2} | 56 |

Temps d'incubation : 18 heures. Température : 37° C.

CONCLUSIONS DE L'ANALYSE DE L'INHIBITION DE LA CROISSANCE PAR LA PENTASÉRINE. — En appliquant les raisonnements élaborés par Shive, on peut tirer la conclusion que l'homologue supérieur de l'homosérine inhibe les synthèses de la thréonine et de la méthionine par *Escherichia coli*.

En effet :

a) Chez les mutants exigeant soit l'*homosérine*, soit la *thréonine* + la *méthionine* (du type B 184), la pentasérine n'est inhibitrice que dans le premier cas.

La présence d'un seul des produits du métabolisme de l'homosérine ne supprime pas totalement l'inhibition, mais augmente l'index d'inhibition.

b) Chez les mutants du type de B 123 et de B 150 qui exigent soit la thréonine plus la méthionine, soit l'homosérine plus un des produits de son métabolisme, l'analyse conduit à la conclusion que la pentasérine inhibe la synthèse des deux métabolites essentiels : thréonine et méthionine.

c) Enfin, chez les mutants exigeant la thréonine, à l'exclusion de l'homosérine (ML 41, B 72 ou ML 52) la lésion biochimique créée par l'analogique existe à l'état naturel, de sorte que le produit de la réaction inhibée doit être fourni à l'état préformé pour assurer la croissance. Il était à prévoir, d'après la méthode d'analyse de Shive, que ce type de mutant devait être insensible à l'action de l'analogique : c'est ce qui a été vérifié.

Le but de cette étude est de confirmer les conclusions ci-dessus par une méthode indépendante.

On a donc étudié l'action de la pentasérine sur la synthèse de la thréonine (à partir d'homosérine) par des suspensions cellulaires et des extraits d'*E. coli* (type sauvage ML et mutant B 184).

II. — ÉTUDE DIRECTE DE L'EFFET DE LA PENTASÉRINE
SUR LA SYNTHÈSE DE LA THRÉONINE.

1^o INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DE LA THRÉONINE PAR LA PENTASÉRINE. — a) *Mutant B 184* (suspensions cellulaires). — La synthèse de la thréonine par les suspensions cellulaires du mutant B 184 est inhibée par la pentaséchine comme le montrent les résultats du tableau VI.

TABLEAU VI. — Inhibition de la synthèse de la thréonine par la pentaséchine chez le mutant B 184 (suspensions cellulaires).

| DL-homosérine initiale : DL - pentasérine : L - thréonine : synthétisée : Rapport pentasérine | | | | |
|---|------------------------------------|---------------------|--|------------|
| (concentration de l'isomère L) (M) | (concentration de l'isomère L) (M) | : m μ mol total | | homosérine |
| 4,75 $\times 10^{-4}$ | 0 | 424 | | - |
| 4,75 $\times 10^{-4}$ | 2,37 $\times 10^{-3}$ | 105 | | 5 |
| 4,75 $\times 10^{-4}$ | 4,75 $\times 10^{-3}$ | 91 | | 10 |
| 4,75 $\times 10^{-4}$ | 9,5 $\times 10^{-3}$ | 45 | | 20 |

Suspension du mutant B 184 : culture sur DL-homosérine 5×10^{-5} M (concentration de l'isomère L). La suspension bactérienne contient 139 μ g N/ml. Temps d'incubation : 60 minutes. Température : 37° C.

b) *Type sauvage ML* (suspensions cellulaires). — La synthèse de la thréonine par les suspensions cellulaires de la souche ML est sensible à la présence de la pentasérine, alors que cet analogue est sans effet sur la croissance de cette souche (tableau VII).

TABLEAU VII. — Inhibition de la synthèse de la thréonine par la pentasérine chez le type sauvage ML (suspensions cellulaires).

| DL - homosérine initiale : DL - pentasérine : L - thréonine : synthétisée | | | |
|---|------------------------------------|---------------------|-----|
| (concentration de l'isomère L) (M) | (concentration de l'isomère L) (M) | : m μ mol total | |
| 4,4 $\times 10^{-4}$ | 0 | | 338 |
| 4,4 $\times 10^{-4}$ | 1,2 $\times 10^{-2}$ | | 171 |

La suspension bactérienne contient 139 μ g N/ml. Temps d'incubation : 50 minutes. Température : 37° C.

2^o SYNTHÈSE NORMALE DE LA THRÉONINE PAR LES EXTRAITS D'*E. coli* EN PRÉSENCE DE PENTASÉRINE (MUTANT B 184). — Dans les extraits

du mutant B 184, la synthèse de la thréonine n'est pas inhibée par la pentasérine, même à des concentrations très élevées de cet analogue (tableau VIII).

TABLEAU VIII. — Synthèse de la thréonine par les extraits du mutant B 184, en absence et en présence de pentasérine.

| DL-homosérine initiale: | DL-pentasérine: | L-thréonine synthétisée: | |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------|--|
| (concentration de l'isomère L): | (concentration de l'isomère L): | μ mol total | |
| (M) | (M) | | |
| 2×10^{-3} | 0 | 2220 | |
| 2×10^{-3} | 4×10^{-2} | 2700 | |

Expérience effectuée en présence de : 20 μg pyridoxal-phosphate ; 25 μmoles A TP et d'une quantité d'extrait (B 184) correspondant à 1500 μg N. Temps d'incubation : 120 minutes. Température : 37° C.

Notons que pour un rapport analogue/homosérine = 20, la synthèse de la thréonine, par les suspensions cellulaires de la même souche B 184, était inhibée de 90 p. 100 (tableau VI).

DISCUSSION

La méthode d'analyse des phénomènes d'inhibition de la croissance par les antimétabolites, introduite par Shive, exige une vérification directe des conclusions auxquelles elle conduit. Cette vérification n'a été apportée que dans un petit nombre de cas dont nous citerons quelques-uns comme exemples :

1° L'analyse de l'inhibition de la croissance bactérienne par les sulfamides conduit à la conclusion que ces composés inhibent compétitivement la synthèse de l'acide ptéroylglutamique à partir de l'acide paraminobenzoïque. Nimmo-Smith, Lascelles et Woods [42] ont montré que des suspensions lavées de *Streptobacterium plantarum* synthétisent l'acide folique à partir de glucose, d'acide paraminobenzoïque (pAB) et d'acide glutamique. La synthèse de l'acide folique par ce système est effectivement inhibée par les sulfamides ; l'inhibition est surmontée par le pAB d'une manière strictement compétitive.

Les cas suivants offrent une vérification des postulats découlant de la méthode d'analyse de Shive avec des systèmes entiers et avec les extraits correspondants :

2° Le thiophényl β-D-galactoside n'est ni un inducteur ni un substrat de la β-galactosidase d'*E. coli*. Toutefois la β-galactosidase a une grande affinité pour ce composé qui est un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse des β-galactosides par les cellules

entières et les préparations extraites (Monod, Cohen-Bazire et Cohn [43]).

Ce résultat correspond exactement à l'activité du thiophényl- β -D-galactoside sur les cultures d'*E. coli* : il inhibe la croissance si la source de carbone est un β -D-galactoside, mais n'inhibe pas la croissance sur maltose.

3° Le 4-méthyl-tryptophane inhibe la croissance d'*E. coli* type sauvage W. A de faibles concentrations d'inhibiteur l'indole supprime l'inhibition due au 4-méthyl-tryptophane. Par contre, le tryptophane supprime l'inhibition d'une manière non compétitive. Des résultats analogues ont été obtenus avec un mutant exigeant soit l'indole, soit le tryptophane pour sa croissance.

Ici encore, la vérification directe montre que le 4-méthyl-tryptophane inhibe compétitivement la synthèse du tryptophane à partir d'indole et de sérine par la tryptophane-synthétase extraite d'*E. coli* (P. Trudinger et G. N. Cohen [44]).

Notre analyse de l'inhibition de la croissance par la pentasérine constitue un cas supplémentaire où la méthode inaugurée par Shive pourrait sembler valable ; en effet, l'étude comparée de l'action de l'homologue supérieur de l'homosérine sur la croissance des souches ML et B 184 et sur l'activité synthétisante des suspensions cellulaires nous a donné des résultats concordants.

Cependant, l'activité synthétisante des extraits du mutant B 184 n'est pas inhibée par la pentasérine.

Il faut donc se demander pourquoi le système est inhibé quand il s'agit de suspensions cellulaires, et ne l'est plus quand on utilise des extraits enzymatiques. Ce fait peut s'expliquer parfaitement si l'on admet que l'inhibition est due à une compétition entre l'antimétabolite (la pentasérine) et le métabolite (l'homosérine) pour un système spécifique de la concentration intrabactérienne du métabolite.

En effet, cette interprétation est fondée sur les expériences récentes de Cohen et Rickenberg [45-46] chez *E. coli*, qui ont montré, à l'aide d'isotopes marqués, l'existence de tels systèmes de concentration qu'ils ont appelés « perméases » pour la valine, la phénylalanine et la méthionine.

D'après ces auteurs, les aminoacides exogènes sont concentrés activement par un système stéréo-spécifique, puis secondairement, sont incorporés dans les protéines cellulaires.

Dans le cas qui nous intéresse, la compétition entre l'homosérine et son antimétabolite ne peut avoir lieu que si la structure de la bactérie est préservée, c'est-à-dire en croissance et en suspension cellulaire. Au contraire, quand on utilise des extraits enzymatiques, puisque la structure de la bactérie est détruite, il n'y a plus compétition, au niveau de la perméase, entre méta-

bolite et antimétabolite et ce dernier n'inhibe pas le fonctionnement de l'enzyme synthétisant la thréonine.

Cette interprétation est d'autant plus vraisemblable que la synthèse de la thréonine à partir d'homoséroline exogène par les suspensions cellulaires du type sauvage ML est inhibée par la pentaséroline, alors que sa croissance normale, c'est-à-dire sa synthèse endogène de thréonine, n'est pas affectée par cet analogue.

Il serait souhaitable que l'interprétation donnée dans ce travail soit confirmée à l'aide d'homoséroline radioactive.

RÉSUMÉ

La pentaséroline inhibe la croissance des mutants auxotropes exigeant l'homoséroline. Toutefois, si la croissance a lieu sur un mélange de thréonine et de méthionine, la croissance n'est pas inhibée. La croissance des mutants ayant perdu la capacité de synthétiser la thréonine à partir d'homoséroline, ainsi que celle des souches de type sauvage, n'est pas affectée par cet analogue de l'homoséroline. La synthèse de la thréonine à partir d'homoséroline par les suspensions cellulaires est inhibée par l'analogue ; par contre, la synthèse de la thréonine par des extraits solubles n'est pas affectée. Ces faits sont interprétés par une inhibition au niveau de la perméation sélective de l'homoséroline.

SUMMARY

INHIBITION OF GROWTH BY α -AMINO- δ -HYDROXY VALERIANIC ACID OF AUXOTROPHIC MUTANTS OF *Escherichia coli* REQUIRING HOMOSERINE.

α -Amino- δ -hydroxy valeric acid inhibits the growth of auxotrophic mutants requiring homoserine. However, if they are grown on a mixture of threonine and methionine, growth is not inhibited. The growth of the mutants, which have lost the capacity of synthesizing threonine from homoserine, as well as that of the wild type, is unaffected by this analogue of homoserine. Threonine synthesis from homoserine by cell suspensions, is inhibited by the analogue ; but threonine synthesis by soluble extracts is unaffected. These facts can be explained by an inhibition at the level of the selective permeation of homoserine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SHIVE (W.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1950, **52**, 1212.
- [2] HARDING (W. M.) et SHIVE (W.). *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 743.
- [3] Woods. (D. D.). *Brit. J. exp. Path.*, 1940, **21**, 74.

- [4] TEAS (H. J.), HOROWITZ (N. H.) et FLING (M.). *J. biol. Chem.*, 1948, **172**, 651.
- [5] TEAS (H. J.). *J. Bact.*, 1950, **59**, 93.
- [6] COHEN (G. N.) et HIRSCH (M. L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 1302.
- [7] COHEN (G. N.) et HIRSCH (M. L.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 182.
- [8] NISMAN (B.), COHEN (G. N.), WIESENDANGER (S. B.) et HIRSCH (M. L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 1342.
- [9] COHEN (G. N.), HIRSCH (M. L.), WIESENDANGER (S. B.) et NISMAN (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 1746.
- [10] HIRSCH (M. L.) et COHEN (G. N.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1954, **15**, 560.
- [11] HIRSCH (M. L.) et COHEN (G. N.). *Biochem. J.*, 1953, **53**, 25.
- [12] NIMMO SMITH (R. H.), LASCELLES (J.) et WOODS (D. D.). *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 264.
- [13] MONOD (J.), COHEN BAZIRE (G.) et COHN (M.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 585.
- [14] TRUDINGER (P. A.) et COHEN (G. N.). *Biochem. J.*, 1956, **62**, 488.
- [15] COHEN (G. N.) et RICKENBERG (H. V.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2086.
- [16] COHEN (G. N.) et RICKENBERG (H. V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 829.

ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* A LA VIOMYCINE ET MÉTHODE DE TITRAGE *IN VITRO*

par P. COLETSOS, E. ORIOT et N. de REGEL (*)

(*Institut Pasteur, Service de la Tuberculose*
[Dr J. BRETEY])

C'est à la IX^e Conférence de Veterans Administration, en avril 1950, que la viomycine a été révélée au public médical et scientifique.

En janvier 1952, l'*American Review of Tuberculosis* consacrait son premier numéro aux travaux des différents chercheurs nord-américains sur la viomycine.

Au cours de notre exposé nous ferons plus spécialement mention des travaux des chercheurs consacrés à l'étude de l'activité bacillostatique de la viomycine *in vitro*.

D'après Steenken et Wolinsky [1, 2], la souche H37Rv est inhibée dans son développement par 0,1 µg de viomycine au dixième jour et par 5 µg au quatorzième et au vingt et unième jour de la culture en milieu de Dubos ; en milieu de Proskauer et Beck sans sérum par 5 µg au dixième, au quatorzième et au vingt et unième jour, et en milieu de Proskauer et Beck avec 10 p. 100 de sérum par 5 µg au dixième et au quatorzième jour et par 10 µg au vingt et unième jour.

D'après G. et A. Youmans [3], en milieu de Proskauer et Beck sans sérum, l'inhibition est obtenue suivant les souches (18 souches examinées) par 3,125 µg à 6,25 µg de viomycine ; et dans le même milieu avec 10 p. 100 de sérum par 6,25 µg à 12,5 µg.

Les mêmes résultats ont été obtenus par Ehrlich, Smith et coll. [4] et par Bartz, Ehrlich, Mold et coll. [5].

D'autre part, Hobby [6], Hobby, Lenert et coll. [7], Finlay et coll. [8] estiment qu'en milieu de Dubos au Tween 80-albumine, 2 à 5 µg/ml de viomycine sont nécessaires pour inhiber le développement de mycobactéries virulentes.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 mars 1957.

Karlson et Gainer [9], qui accordent, comme nous-mêmes [10], leur préférence aux milieux solides, ont trouvé que 8 µg de viomycine sont nécessaires pour inhiber la culture sur milieu de Proskauser et Beck additionné d'œuf et de gélose.

En France, Gernez-Rieux, Tacquet et Chenet [11] situent le taux bactériostatique en milieu de Dubos entre 2,5 µg et 5 µg/ml.

Sur milieu de Jensen, 25 à 50 µg/ml de viomycine sont nécessaires lorsque l'antibiotique est incorporé au milieu avant coagulation.

Personnellement, nous avons rapporté en 1951 [12] que le taux maximum de viomycine nécessaire pour provoquer une bactériostase totale de 10^{-4} mg de bactéries cultivées sur milieu solide de Jensen était de 10 µg/cm². Ce résultat est obtenu à condition que la viomycine, drogue thermolabile [5, 8], soit ajoutée au milieu de Jensen en surface et après la coagulation du milieu [13].

Dans le présent exposé nous mettons en parallèle les milieux de titrage les plus usuels afin de mieux comparer le comportement respectif des souches bacillaires dans chacun de ces milieux.

I. — TESTS DE SENSIBILITÉ EN MILIEU DE DUBOS ET EN MILIEU DE YOUMANS.

Conditions d'expérience : Comme milieux liquides nous avons utilisé :

a) Le milieu de Dubos au Tween 80 distribué dans des tubes de 22 mm, additionné extemporanément de 0,5 ml d'un mélange d'albumine, fraction V, à 5 p. 100 et de glucose à 5 p. 100 [14] ;

b) Le milieu de Youmans distribué également en tubes de 22 mm, additionné extemporanément de 0,5 ml de sérum de bœuf et sous le volume total de 5 ml [15].

Antibiotique : Dilutions progressives en eau bidistillée stérile selon le mode habituel. La quantité introduite dans chaque tube est de 0,2 ml.

Souches : Cultures en milieu de Dubos au Tween 80-albumine, âgées de 8 à 10 jours. La dose d'ensemencement par tube, y compris les deux tubes témoins, est de 0,01 mg sous un volume de 0,2 ml.

Les souches suivantes ont été testées : H37Rv, H37Rv streptomycino-résistante (50 µg/ml), H37Rv PAS-résistante (5 µg/ml) et H37Rv INH-résistante [10 µg/ml] (fig. 1).

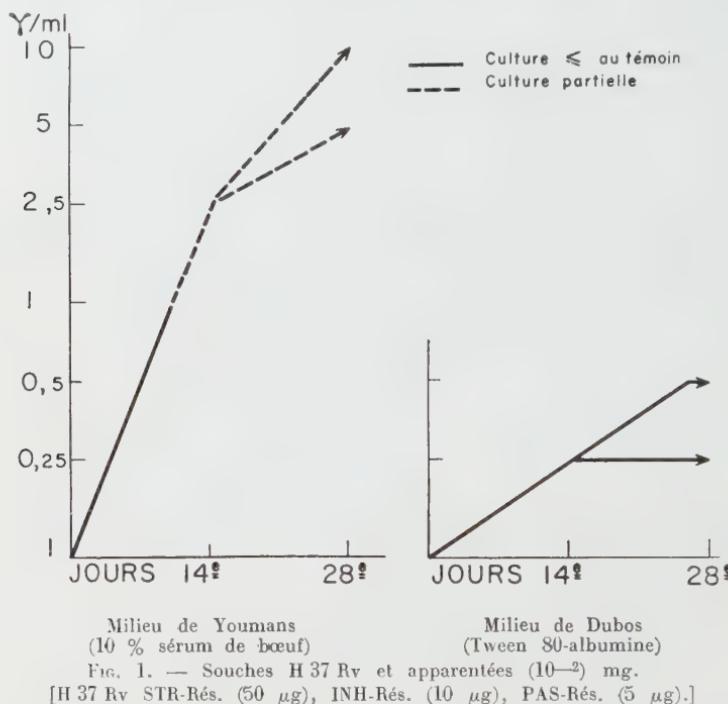
La souche danoise E5 provenant de la collection du professeur K. A. Jensen (fig. 2).

Enfin, la souche Brévannes et un certain nombre de souches récemment isolées d'expectorations bacillifères ont été examinées et ont donné des résultats comparables aux souches précédentes.

RÉSULTATS. — Deux lectures, la première au quatorzième jour de l'incubation à l'étuve à 37°, la deuxième au vingt-huitième jour d'incubation.

La progression du développement est figurée sur les figures 1 et 2. Côté gauche en milieu de Youmans au sérum, côté droit en milieu de Dubos Tween-Albumine.

La différence d'activité de la viomycine en milieu de Dubos et en milieu de Youmans est assez nette. En outre, la progression

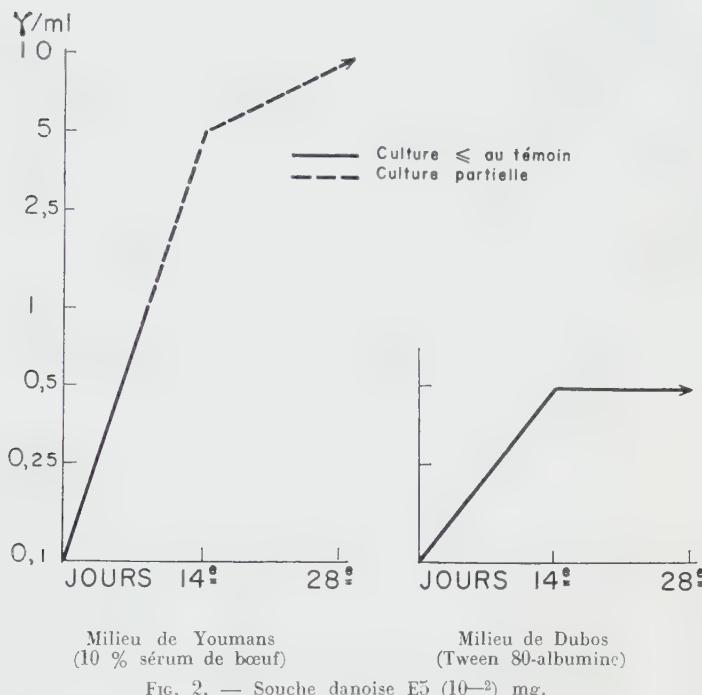


Milieu de Youmans
(10 % sérum de bœuf)
Milieu de Dubos
(Tween 80-albumine)
Fig. 1. — Souches H 37 Rv et apparentées (10^{-2}) mg.
[H 37 Rv STR-Rés. (50 μ g), INH-Rés. (10 μ g), PAS-Rés. (5 μ g).]

de la culture est peu marquée en Dubos après le quatorzième jour, alors qu'elle se poursuit en milieu de Youmans.

Nous reconnaissons que le taux bactériostatique trouvé par nous en milieu de Dubos est beaucoup plus faible que celui trouvé par de nombreux auteurs. Est-ce dû à la qualité du Tween utilisé ? Nous n'avons pas pu l'établir de façon formelle.

Toujours est-il que, compte tenu des réserves que nous avons formulées à l'égard des méthodes de titrage indirect et par surcroît en milieu de culture liquide [40], pour ce qui concerne le titrage à la viomycine en milieu liquide, c'est au milieu de Dubos qu'irait notre préférence.

Fig. 2. — Souche danoise E5 (10^{-2}) mg.

II. — TEST DE SENSIBILITÉ SUR MILIEU SOLIDE.

Conditions d'expériences. — Milieu de culture : Löwenstein-Jensen à 0,75 g p. 100 de glycérine distribué en tubes de Legroux et coagulé par la chaleur en atmosphère saturée de vapeur pendant quarante-cinq minutes à 85°.

Répartition de l'antibiotique : Pour la technique détaillée cf. [13]. Les dilutions successives sont effectuées non pas dans de l'eau bidistillée, mais dans une solution de tournesol (indicateur de pH) à 40 g pour 1 litre d'eau bidistillée.

Des taux convenables d'antibiotique dissous dans le bleu de tournesol sont introduits dans chaque tube de Legroux. Les concentrations d'antibiotique sont évaluées au centimètre carré.

Le tube de Legroux ayant 50 cm² de surface, il faut introduire respectivement et sous un volume de 0,5 ml : 50, 250, 500 µg pour obtenir 1, 5, 10 µg par centimètre carré.

Après étalement et évaporation pendant quelques heures à la

température du laboratoire, les tubes sont prêts pour l'ensemencement.

Par le mode d'imprégnation en surface, l'antibiotique est intégralement respecté dans sa composition chimique du fait qu'il est ajouté après coagulation et n'entre pas dans la composition du milieu ; son action bactériostatique s'exerce en s'interposant entre le milieu nutritif sous-jacent et les bacilles ensemencés après sa fixation, sous forme d'une mince pellicule, sur la surface du milieu.

Ces conditions particulières assurent au milieu ainsi imprégné une stabilité remarquable pendant plusieurs semaines à la température du laboratoire, comme l'indique le tableau ci-joint.

TABLEAU I. — Taux bactériostatique pour H37Rv (10^{-4} mg) par tube après un mois d'incubation à l'étuve à 37°.

| ANTIBIOTIQUES EN SURFACE TUBES DE LEGROUX Concentrations indiquées au cm ² | | | |
|--|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Milieux préparés 24h avant | Milieux conservés 21 jours 40° | Milieux conservés 21 jours 22° |
| STREPTOMYCINE | 0,25 µg | 0,5 µg | 0,5 µg |
| I.N.H. | 0,05 µg | 0,075 µg | 0,075 µg |
| P.A.S. | 0,075 µg | 0,1 µg | 0,1 µg |
| VIOMYCINE | 7,5 µg | 7,5 µg | 10 µg |
| CYCLOSERINE | 10 µg | - | 12,5 µg |

Souches : Les mêmes que pour les milieux liquides. Ensemencement à la dose de 10^{-4} mg de bacilles par tube.

Chaque souche est ensemencée sur une série de 12 tubes imprégnés respectivement de 1, 2,5, 5, 7,5, 10 et 20 µg d'antibiotique par centimètre carré, plus 6 tubes témoins, dont 2 avec 10^{-4} , 2 avec 10^{-5} et 2 avec 10^{-6} mg.

Ainsi, le pourcentage de colonies à chaque concentration est établi d'après l'image d'un témoin correspondant et non d'après une estimation visuelle approximative de la différence de densité des colonies, qui risque d'entraîner des erreurs d'appréciation parfois considérables.

Les séries de viomycine à l'usage clinique comprennent, outre les tubes témoins, 10, 20, 40 et 80 µg/cm².

RÉSULTATS.

Pour les souches humaines, on fait la première lecture la troisième semaine qui suit l'ensemencement, la deuxième lecture après un mois, la troisième après six semaines.

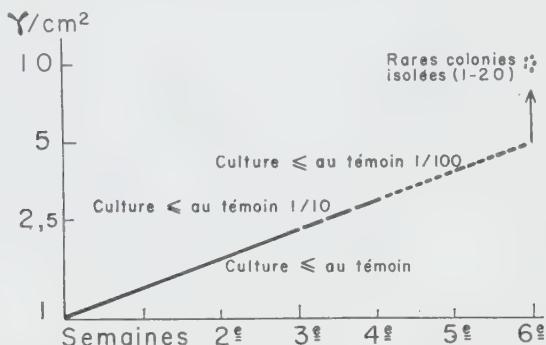


FIG. 3. — Souches H37Rv et apparentées (10^{-4}) mg. Milieu de Jensen en tubes de Legroux. Surface 50 cm^2 . Viomycine en surface après coagulation du milieu. Concentrations : $1 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, etc., au cm^2 .

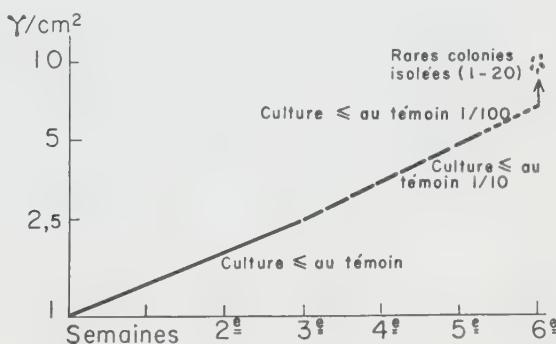


FIG. 4. — Souches E5 et Brévannes (10^{-4}) mg. Milieu de Jensen en tubes de Legroux. Viomycine en surface.

Pour les souches bovines, la première lecture a lieu la quatrième semaine qui suit l'ensemencement.

Nos pourcentages, étayés sur les témoins correspondants (comme indiqué plus haut) sont représentés dans les figures 3 et 4 d'où il ressort :

a) Que l'immense majorité des bacilles contents dans une

souche sont inhibés dans leur multiplication par 5 µg de viomycine ;

b) Que la plupart des souches sont intégralement inhibées par 10 µg de viomycine ;

c) Que certaines souches (E5 et 1 sur 10 souches de malades) peuvent contenir 1 à 2 pour 10 000 éléments bacillaires capables de se développer en présence de 10 µg de viomycine.

Sans vouloir préjuger de la signification de ces rares éléments dans le développement ultérieur du phénomène de la résistance, ce fait, à lui seul, suffit pour que nous nous inscrivions en faux contre la proposition de la sous-commission des méthodes de laboratoire de la Veterans Administration, dans son rapport à la XII^e Conférence du 9-12 février 1953, qui suggère de considérer comme largement résistante à la viomycine, toute souche qui donnerait une culture franchement positive en présence de 10 µg de viomycine.

CONCLUSIONS.

De l'étude de l'activité bacillostatique de la viomycine *in vitro* par des méthodes et des milieux de culture différents et plus spécialement par la méthode de titrage sur milieu solide en tubes de Legroux, il ressort :

1^o Que le plus grand nombre des souches sont inhibées dans leur développement en présence de 10 µg de viomycine ;

2^o Que certaines souches (1 sur 10 environ) peuvent contenir 1 à 2 bacilles pour 10 000 capables de se développer en présence de 10 µg de viomycine ;

3^o Que rien ne nous autorise, pour le moment, à considérer comme résistantes les souches ayant un tel comportement, bien au contraire.

SUMMARY

STUDIES ON *in vitro* SENSITIVITY OF *M. tuberculosis* TO VIOMYCIN TECHNIQUE OF TITRATION.

The study of *in vitro* bacteriostatic activity of viomycin with different media and different methods (especially the titration method in Legroux tubes) shows that :

1^o Most strains are inhibited by 10 µg of viomycin.

2^o Certain strains (about 1 out of 10) may contain 1 to 2 bacteria out of 10 000 able to grow in presence of 10 µg of viomycin.

3^o Nothing allows to consider these strains as resistant ones.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] STEENKEN (W. Jr) et WOLINSKY (E.). *The Ninth Streptomycin Conference of the Veterans Administration*, 18-21 avril 1950, p. 189.
- [2] STEENKEN (W. Jr) et WOLINSKY. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 30.
- [3] YOUNMANS (G. P.) et YOUNMANS (A. S.). *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 25.
- [4] EHRLICH (J.), SMITH (R. M.), PANNER (M. A.), ANDERSON (L. E.) et BRATTEN (A. C. Jr). *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 7.
- [5] BARTZ (R.), EHRLICH (J.), MOLD (J. D.), PANNER (M. A.) et SMITH (R. M.). *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 4.
- [6] HOBBY (G. L.). *The Ninth Streptomycin Conference of the Veterans Administration*, 18-21 avril 1950, p. 192.
- [7] HOBBY (G. L.), LENERT (T. F.), DONIKIAN (M.) et PIKULA (D.). *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 17.
- [8] FINLAY (A. C.), HOBBY (G. L.), HOCHSTEIN (F.), LEES (T. M.), LEWERT (T. F.), MEANS (J. A.), P'AN (S. Y.), REGNA (P. P.), ROUTIEN (J. B.), SOBIN (B. A.), TATE (K. B.) et KANE (J. H.). *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 1.
- [9] KARLSON (A. G.) et GAINER (J. H.). *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 36.
- [10] COLETSOS (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 491 ; *Ann. Biol. clin.*, 1953, n° 10-12, p. 563.
- [11] GERNEZ-RIEUX, TACQUET et CHENET. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 158.
- [12] COLETSOS (P.). *Rev. Tub.*, 1951, **45**, 957.
- [13] COLETSOS (P.), BOISVERT (H.) et ORIOT (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 288 et *Presse méd.*, 1951, **82**, 1772.
- [14] DUBOS (R. J.) et MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **56**, 334.
- [15] YOUNMANS (G. P.), WILLINSTON, FELDMAN et HINSHAW. *Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic*, 1946, **21**, 126. — WILLINSTON et YOUNMANS. *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 536.
- [16] JENSEN (K. A.), LESTER et TOLDERLUND. *Acta scand.*, 1940, **14**, 125.

DE L'ACTION CYTOPATHOGÈNE DU VIRUS VACCINAL EN CULTURE DE TISSUS ET DE L'HYPOTHÈSE D'UN EFFET CYTOTOXIQUE

par J. VIEUCHANGE, G. de BRION et J. GRUEST (*)

(*Institut Pasteur*)

Le virus vaccinal a été cultivé en culture de tissus (1) avec des techniques variées : goutte pendante, méthode de Maitland-Rivers, tubes roulants, cellules trypsinisées.

A nous en tenir à l'action du virus sur les cellules, nous rappellerons que, dès 1906, Aldershoff et Broers ont observé la formation des corps de Guarnieri, dans des tissus prélevés sur l'animal et maintenus en survie *in vitro* [1], et ceci, avant même que la méthode de culture de tissus ait été proposée et décrite en tant que telle. De plus, pour certains types de tissus cultivés *in vitro*, un effet cytopathogène a été observé. Benedek et Kempe [2] ont décrit cette action du virus vaccinal sur les fibroblastes et les cellules épithéliales, dérivés des tissus d'embryon de poulet (2) et d'embryon humain (peau, muscle et rein). Noyes [3] a infecté avec le virus vaccinal des cultures de tissus d'embryon de poulet en couche monocellulaire, selon la technique proposée par Dulbecco [4] et obtenu un nombre de plaques de destruction cellulaire en rapport avec la concentration du virus et la réduction du nombre de ces plaques au moyen d'un antisérum.

Scherer et Syverton [5] ont observé une action cytopathogène du virus vaccinal à l'égard d'une souche de cellules épithéliales d'origine humaine (souche HeLa, Gey).

D'autre part, au cours d'un échange régulier d'informations, nous avions été tenus au courant des premiers résultats obtenus à l'Institut Pasteur d'Iran par Boué et Baltazard [6] avec le virus variolique sur culture d'explants de rein de lapin nouveau-né

(*) Manuscrit reçu le 30 mars 1957.

(1) Voir la revue générale de M. Sanders, I. Kiem et D. Lagunoff. *Arch. Pathol.*, 1953, **56**, 148.

(2) Il résulte d'un travail de Tyrrel que l'effet cytopathogène du virus vaccinal s'exerce de la même façon sur les cellules dérivées d'explants de foie ou de poumon d'embryon de poulet cultivés *in vitro*. D. A. J. TYRREL. *J. Immunol.*, 1955, **74**, 293.

en tubes roulants : le virus variolique produit un effet cytopathogène aussi bien sur les fibroblastes que sur les cellules épithéliales. L'intérêt de ces résultats nous a paru tel que nous avons entrepris des recherches parallèles sur le virus vaccinal, qui devraient être l'amorce d'une étude comparée des deux virus en utilisant un même type de culture cellulaire.

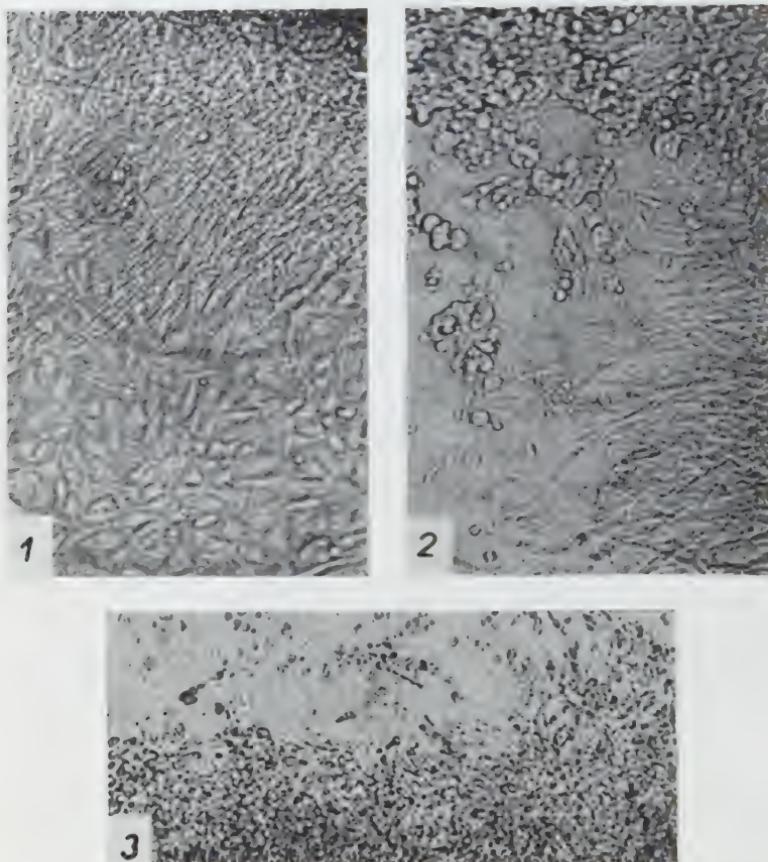
TECHNIQUE : Virus. — Le neurovaccin (souche C. Levaditi) est entretenu au laboratoire par passages sur membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet. Dans les essais dont nous rapportons les résultats, le matériel virulent était constitué par une suspension à 1 p. 10 de membranes chorio-allantoïdiennes récoltées le troisième jour après l'inoculation de virus vaccinal, suspension conservée à — 70°, titrant 10⁶ unités infectieuses pour 0,1 ml inoculé sur la membrane.

Culture des tissus. — La technique de culture de tissus est celle-là même que nous avons utilisée pour la culture en tubes roulants des explants de rein de lapin adulte, tissu qui nous a antérieurement permis d'obtenir la multiplication du virus rabique [7]. Au milieu d'Enders que nous avions employé pour ces essais sur la rage, nous avons substitué le milieu à la lactalbumine de Melnick : solution de lactalbumine à 5 p. 100, 100 ml ; solution de Hanks bicarbonatée, 670 ml ; liquide amniotique bovin, 230 ml ; constituants auxquels sont ajoutés 100 unités de pénicilline et 250 µg de streptomycine par millilitre.

Titrage du pouvoir infectieux. — Les milieux prélevés pour titrage du pouvoir infectieux ont été centrifugés immédiatement après le prélèvement, afin d'éliminer les cellules, puis inoculés, à des concentrations variées, à la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet.

Neutralisation du virus par l'immunsérum. — On a utilisé le sérum de lapins inoculés de virus vaccinal (souche neurovaccin) par voie intradermique et saignés le vingtième jour après l'inoculation. L'épreuve de neutralisation mettait en contact le virus (dose fixe) et l'immunsérum (dose variable) en volumes égaux.

Expériences et résultats. — Nous avons tout d'abord étudié l'action cytopathogène du virus vaccinal sur les cellules cultivées à partir des explants de rein de lapin nouveau-né. Dans les conditions de nos expériences, des cultures de ce tissu donnent lieu à un développement rapide et abondant de deux types cellulaires : des fibroblastes et des cellules épithéliales ; en général, dès le lendemain, on observe, à la périphérie des explants, l'apparition de bouquets de fibroblastes et de petits bourgeons de cellules épithéliales. Le troisième jour, le développement des fibroblastes est abondant : ils forment une ceinture continue autour de quelques explants ; sur d'autres, ils alternent avec de



Action cytopathogène du virus vaccinal sur les cellules épithéliales et les fibroblastes des explants de rein de lapin nouveau-né, cultivés en tubes roulants.

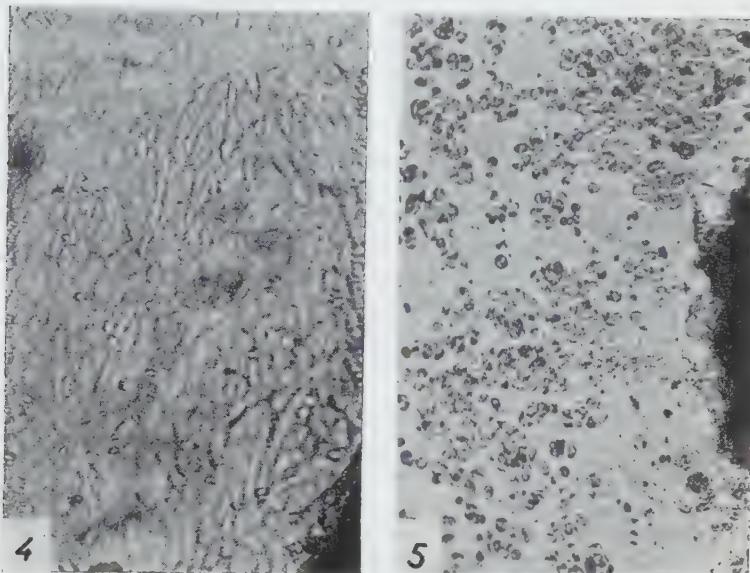
FIG. 1. — Culture de tissus témoin (la culture conserve le même aspect pendant la durée de l'essai).

FIG. 2. — Culture de tissus infectée ; état des cellules au deuxième jour après l'inoculation : nécrose des cellules épithéliales ; intégrité des fibroblastes.

FIG. 3. — Culture de tissus infectée ; état des cellules au huitième jour après l'inoculation : nécrose des deux types cellulaires. (Gross. \times 87.)

belles nappes de cellules épithéliales, assez étendues pour remplir le champ du microscope, au grossissement utilisé (jusqu'à $\times 100$).

Si le virus est inoculé à ce moment-là, on n'observe pas, dix-huit heures après, de modifications dans l'aspect des fibroblastes. Par contre, dès ce moment, on note, au niveau des nappes épithéliales, des brèches plus ou moins arrondies, bordées de cellules dégénérées et des altérations cellulaires s'étendant à toute la



Action cytopathogène du virus vaccinal sur les cellules épithéliales des explants de rein de lapin adulte, cultivées en tubes roulants.

FIG. 4. — Culture de tissus témoin.

FIG. 5. — Culture de tissus infectée ; nécrose des cellules épithéliales au deuxième jour après l'inoculation. (Gross. $\times 87$.)

nappe épithéliale observée : cellules dissociées les unes des autres, rabougries, granuleuses, ayant perdu leur transparence normale.

A la trente-sixième heure, le contraste persiste entre l'aspect des cellules épithéliales et celui des fibroblastes : ceux-ci conservent leur apparence normale, comparable à celle des fibroblastes des cultures témoins non infectées. Ce n'est que vers le sixième ou le septième jour que l'on a observé la dégénérescence des fibroblastes sous l'action du virus et leur nécrose.

Le pouvoir infectieux du milieu nutritif a été titré aux dix-huitième, vingt-quatrième et trente-sixième heures. L'inoculation

à la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet, de 0,1 ml de la dilution 10^{-3} des liquides prélevés à ces divers temps, a donné lieu à une moyenne de 0,5 pustule à la dix-huitième heure, de 1 pustule à la vingt-quatrième heure et de 2 pustules à la trente-sixième heure.

L'action nécrosante du virus vaccinal à l'égard des cellules épithéliales a été contrôlée sur des explants de rein de lapin adulte cultivés en tubes roulants et dans les mêmes conditions. On a pris soin de ne mettre en culture que des fragments de la zone corticale, ce qui permet d'obtenir, dès le quatrième jour, des nappes plus ou moins continues de cellules épithéliales, bordant les explants ; les fibroblastes sont pratiquement absents. Le cinquième jour, alors que la continuité des nappes épithéliales tend à s'établir, on ensemence le virus vaccinal.

Dix-huit heures après cette inoculation, les cellules épithéliales sont altérées dans leur ensemble : elles se séparent les unes des autres, prennent un aspect rabougrî, deviennent granuleuses et se nécrosent. Par contre, les cellules épithéliales des cultures témoins non infectées sont très belles ; et ce contraste persiste les jours suivants.

Le titrage du pouvoir infectieux du milieu nutritif à la quarante-huitième heure a montré une légère augmentation de la quantité de virus : le nombre d'unités infectieuses par tube était de 2×10^5 au moment de l'inoculation, alors qu'il était de $4,4 \times 10^5$ au moment du titrage.

Action des immunséums. — En utilisant le sérum des lapins immunisés à l'égard du virus jennérien, il est possible de mettre en évidence une action empêchant l'action cytopathogène du virus ; l'essai a été effectué au moyen de cellules épithéliales dérivées de reins de lapins adultes. Les divers tubes de cultures de tissu ont reçu un mélange de virus et d'immunsérum. La dose de virus était fixe (5×10^4 unités infectieuses, par tube), la concentration d'immunsérum variable (concentrations finales : 1/2, 1/8, 1/32, 1/128, 1/512). Des tubes témoins recevaient soit le virus seul, soit l'immunsérum seul, soit le mélange de virus et de sérum neuf, soit le sérum neuf seul.

Une protection totale a été observée avec le mélange de virus et d'immunsérum à la concentration 1/2 et un effet moins marqué et même nul, si la dilution de l'immunsérum était plus élevée. Pour la concentration la plus faible, l'action cytopathogène était identique à celle qu'on observait dans les tubes témoins (virus seul ; virus et sérum normal). Les cellules qui avaient été protégées par la concentration la plus forte d'immunsérum ne différaient dans leur aspect ni des cellules témoins ni des cellules qui avaient été en contact avec l'immunsérum seul ou le sérum normal seul.



Le virus libéré dans le milieu nutritif ne dépasse jamais, dans nos essais, un titre supérieur à 2×10^4 unités infectieuses par 0,1 ml de milieu. Ainsi l'augmentation du taux de virulence après l'inoculation est minime.

D'autre part, il n'a pas été possible de mettre en évidence un pouvoir agglutinant sur des hématies sensibles à l'action de l'hémagglutinine vaccinale.

Ainsi, ni la destruction des cellules épithéliales vers la dix-huitième heure, ni celle des fibroblastes vers le septième jour après l'inoculation du virus, ne coïncident avec une élévation sensible du taux du virus dans le milieu. Il n'y a pas de libération importante de virus consécutive à la nécrose cellulaire.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux qu'à obtenus Scherer [8] en inoculant le virus vaccinal à des cultures de fibroblastes de la souche L : le virus exerce une action agglutinante particulière sur ces cellules, et cette agglutination s'accompagne d'une chute progressive du taux de virus ; l'agglutination des cellules est sans rapport avec la multiplication du virus. De même, il ne semble pas que la nécrose cellulaire observée dans nos essais dépende de la prolifération du virus dans les cellules.

Dans ces conditions, on peut se demander si l'effet cytopathogène que nous avons observé sur les cellules épithéliales et les fibroblastes développés à partir des explants de tissu rénal de lapin, n'est pas dû à quelque facteur toxique, soit distinct des corps élémentaires eux-mêmes, soit lié à ceux-ci.

Des essais sont en cours afin de préciser les rapports éventuels pouvant exister entre cet effet cytotoxique et deux phénomènes que l'un de nous avait observés antérieurement : d'une part, les manifestations obtenues avec les suspensions de tissus infectés de virus vaccinal, lorsqu'elles sont injectées par voie intradermique chez le lapin et qui nous avaient conduits à admettre la présence d'un « facteur toxique filtrable » [9] ; et, d'autre part, l'action létale et congestive du virus vaccinal sur l'embryon de poulet, observée au cours d'expériences déjà anciennes et demeurées inédites [10].

Bien qu'il ne soit pas possible de définir la nature exacte de l'action cytopathogène du virus vaccinal en cultures de tissus, il semble toutefois qu'on soit en droit d'interpréter ce phénomène comme une action cytotoxique.

CONCLUSIONS. — Lorsqu'on inocule le virus vaccinal à des cultures en tubes roulants de rein de lapin, qu'il s'agisse d'animaux nouveau-nés ou d'animaux adultes, on observe un effet cytopathogène précoce, dès la dix-huitième heure, à l'égard des

cellules épithéliales. Les fibroblastes ne sont détruits que vers le sixième ou le septième jour.

En utilisant un immunsérum spécifique, il est possible de mettre en évidence un pouvoir empêchant cette action cytopathogène du virus vaccinal. Cette réaction d'empêchement donne des renseignements quantitatifs.

L'action cytopathogène exercée par le virus vaccinal dans les conditions de nos expériences, contraste avec la faiblesse du taux du virus libéré dans le milieu nutritif. La nature toxique de cette action est discutée.

SUMMARY

STUDIES ON THE CYTOPATHOGENIC ACTIVITY OF VACCINIA VIRUS AND THE POSSIBILITY OF A CYTOTOXIC EFFECT.

Vaccinia virus (neurovaccinia strain, C. Levaditi) possesses a cytopathogenic activity on rabbit renal tissue in roller-tube cultures. Epithelial cells and fibroblasts develop from explants of new-born rabbit kidney. Vaccinia virus added to these cultures affects epithelial cells after an 18 hours delay, whereas fibroblasts start degenerating only after 7 or 8 days. From adult rabbit kidney, epithelial cells develop, which start degenerating after 18 hours contact with the virus and rapidly disintegrate.

The destruction of epithelial cells and of fibroblasts is followed by a very slight increase of the virus titer in the culture medium ; in other words, there is no important release of virus after cell necrosis. Although the exact nature of the cytopathogenic activity of vaccinia virus in tissue culture remains a problem for further experimentation, the authors believe that this activity might be due to a cytotoxic effect.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALDERSHOFF (H.) et BROERS (G. M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1906, **20**, 779.
- [2] BENEDEK (A. L.) et KEMPE (C. H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1953, **82**, 520.
- [3] NOYES (W. F.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **83**, 426.
- [4] DULBECCO (R.). *Proc. nat. Acad. Sci., N. Y.*, 1952, **38**, 747.
- [5] SCHERER (W. F.) et SYVERTON (J. T.). *Am. J. Pathol.*, 1954, **30**, 1057.
- [6] BOUÉ (A.) et BALTAZARD (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **243**, 1176.
- [7] VIEUCHANGE (J.), BÉQUIGNON (R.), GRUEST (J.) et VIALAT (C.). *Bull. Acad. Med.*, 1956, 77.
- [8] SCHERER (W. F.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **80**, 598.
- [9] VIEUCHANGE (J.). *Bull. Acad. Méd.*, 1940, **123**, 101.
- [10] VIEUCHANGE (J.). *Expériences inédites*.

L'ANTIGÈNE POLIOMYÉLITIQUE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT INTRACELLULAIRE DU VIRUS

par Jacqueline LEBRUN (*) (**) .

(*Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne*)

Le virus de la poliomyélite a été localisé dans les cellules infectées, au moyen d'anticorps fluorescents, par Coons et Weller [1]. Utilisant la même technique, Buckley [2] a suivi le sort de l'antigène viral dans la cellule épithéliale de rein de singe cultivée *in vitro*. D'après Buckley, l'antigène apparaît d'abord dans le cytoplasme à l'état de traces entre la troisième et la cinquième heure après l'infection. Puis la quantité d'antigène augmente, sous forme granuleuse ou diffuse, toujours dans le cytoplasme. Enfin, vers les huitième et douzième heures, l'antigène fait son apparition dans le noyau. Il faut remarquer que, dans ces expériences, la multiplicité initiale était certainement faible, ainsi qu'en témoigne le long délai (quarante heures) nécessaire pour obtenir la dégénérescence de la majorité des cellules.

On sait que, dans une culture de rein de singe infecté par le virus de la poliomyélite (type I), la libération du virus commence dès la troisième heure après l'infection. Elle est terminée à la septième heure (Dulbecco et Vogt [3]). La dégénérescence est dès ce moment totale. Si une petite fraction seulement des cellules est infectée au début, l'observation des premiers stades de la multiplication intracellulaire du virus est nécessairement difficile. De plus, la chronologie des stades n'a de valeur qu'avant la première libération de virus, c'est-à-dire le premier cycle de multiplication.

Afin de déterminer le temps d'apparition de la protéine virale par rapport à celui de la particule infectieuse complète, nous avons repris le même type d'expérience, utilisant aussi la technique de Coons, mais en nous plaçant dans les conditions d'un cycle unique de croissance.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 avril 1957.

(**) Travail effectué avec l'aide d'une subvention de la « National Foundation for Infantile Paralysis » des Etats-Unis d'Amérique.

TECHNIQUES.

1^o *Culture de cellules.* — Les cellules utilisées sont des cellules cancéreuses humaines souche KB de Eagle [4] entretenues dans le milieu classique contenant de l'hydrolysat de lactalbumine, de l'extrait de levure de bière et 5 p. 100 de sérum de cheval. Ces cellules sont cultivées sur des lamelles de verre (12 × 32 mm) dans des tubes du type Porter.

2^o *Infection.* — Le virus poliomyélitique utilisé est du type I Brunhilde souche KP₄ atténuée, que nous devons à l'obligeance de A. Sabin. Le stock est obtenu sur des cultures de cellules KB. Après avoir éliminé le milieu de culture on introduit, dans le tube contenant 2×10^5 cellules, 0,2 cm³ d'une suspension renfermant $1,4 \times 10^7$ /cm³ unités formatrices de plages (U. F. P.), soit au total $2,8 \times 10^6$ U. F. P. Après une demi-heure d'adsorption à 37°, on ajoute du milieu neuf.

3^o *Coloration par les anticorps fluorescents.* — L'antigène poliomyélitique a été mis en évidence dans les cellules par la méthode dite indirecte décrite par Coons et Weller [1]. Les préparations prélevées à divers temps après l'infection sont lavées, séchées, fixées par l'acétone, séchées à nouveau, puis traitées de la façon suivante :

1. Addition de III gouttes de sérum humain dilué au cinquième contenant des anticorps anti-poliomyélitiques des trois types : trente minutes ;

2. Lavage avec une solution physiologique tamponnée à pH 7 : dix minutes ;

3. Addition de III gouttes de sérum de lapin, fluorescent, anti-globuline humaine. Le sérum a été préalablement adsorbé deux fois avec 100 mg de poudre de rate de singe pour éliminer les colorations non spécifiques : trente minutes ;

4. Lavage : dix minutes ;

5. Montage des lames en glycérol tamponné à pH 7 ;

6. Examen au microscope à fluorescence.

Les préparations servant de témoin sont de deux types :

a) Cultures de cellules KB non infectées traitées comme précédemment,

b) Cultures de cellules KB infectées pour lesquelles le temps 1 a été omis.

RÉSULTATS.

Zéro heure. Préparations témoins et cellules infectées : le cytoplasme présente une faible autofluorescence bleuâtre diffuse.

Une heure. 10 p. 100 environ des cellules infectées ont un cytoplasme faiblement fluorescent. Cette coloration est généralement

diffuse. Plus rarement, la fluorescence est limitée à une région étroite ; elle est alors d'aspect granulaire.

Deux heures. Le nombre des cellules fluorescentes a augmenté (25 p. 100 environ) ; l'intensité de la fluorescence reste faible généralement diffuse.

Trois heures. 50 p. 100 des cellules sont fluorescentes à des degrés divers. Les cellules les plus fluorescentes sont souvent arrondies, le cytoplasme formant un large anneau fluorescent autour du noyau sombre.

Quatre heures. La grande majorité des cellules sont colorées. Certaines cellules sont intensément fluorescentes, les noyaux ne sont pas colorés.

Cinq heures. Même aspect que précédemment ; apparition de taches fluorescentes dans quelques noyaux.

Six heures et sept heures. Les cellules sont en voie de dégénérescence ; toutes sont fluorescentes ainsi que les résidus cellulaires. La plupart des noyaux encore reconnaissables présentent des taches fluorescentes.

DISCUSSION.

Dans les cellules KB infectées par le virus de la poliomyélite (type I Brunhilde atténué), la protéine antigène est donc décelable dès la première heure après l'infection, c'est-à-dire bien avant l'apparition des premières particules infectieuses dans le milieu. La courbe de libération de la souche KP₄ par les cellules KB est, en effet, nous l'avons constaté, identique à celle de rein de singe : le virus commence à apparaître dans le milieu trois heures après l'infection, la production est terminée quatre heures plus tard.

Certains virus animaux sont libérés très peu de temps, quelques minutes, après leur formation. Tel est le cas des virus de l'encéphalite équine de l'Ouest, de la stomatite vésiculeuse et de la maladie de Newcastle. On ne possède pas de renseignements aussi précis sur le virus de la poliomyélite. D'après un travail de Reissig et coll. [5], le virus intracellulaire n'apparaîtrait qu'après la troisième heure qui suit l'infection. Toutefois, dans les expériences de ces auteurs, la libération du virus est tardive (cinquième heure). Tout ce que l'on peut dire, c'est qu'il est possible, mais peu probable que des particules infectieuses soient présentes dans la cellule KB une heure après l'infection par le virus. Nos résultats semblent donc indiquer que la protéine antigénique apparaît sensiblement avant les particules infectieuses. Au cours de la période de libération du virus dans le milieu, l'antigène est présent dans le cytoplasme seulement. Cette observation confirme celle de Buckley [2]. Elle est en accord avec les

résultats que Kaplan et Melnick [6] ont obtenus par la technique de fractionnement des constituants cellulaires. L'antigène est réparti dans tout le cytoplasme à l'état diffus ou finement granulaire. Nous n'avons pas observé d'image rappelant l'inclusion cytoplasmique caractéristique de l'infection par le virus de la poliomyélite. La méthode de Coons n'a pas fourni non plus de données concernant les centres de reproduction du virus dont l'existence a été suggérée par Dulbecco [7].

D'après nos observations, l'antigène n'apparaît dans le noyau que lorsque la dégénérescence des cellules est déjà très marquée. L'hypothèse la plus vraisemblable est qu'il y pénètre à la faveur de lésions de la membrane nucléaire. Sabin et Ward [8], Bodian [9] et récemment Reisig et coll. [5] ont observé, comme première altération cellulaire, des modifications de la chromatine et des inclusions intranucléaires. Nous avons vu que, durant les premières heures de la maladie cellulaire, le noyau ne contient pas d'antigènes décelables par la méthode de Coons. Ce fait n'infirme pas l'hypothèse d'une participation du noyau au processus de synthèse du matériel viral ; il indique tout au plus que le noyau ne prend pas part à la synthèse de la protéine antigénique.

CONCLUSIONS.

1° Nos observations confirment l'état finement granulaire ou diffus de l'antigène du virus poliomyélitique au cours de l'évolution de l'infection cellulaire.

2° Elles montrent que l'apparition de l'antigène est précoce puisque l'antigène peut être décelé dans 10 p. 100 des cellules une heure après l'infection.

3° Jusqu'à la cinquième heure après l'infection, l'antigène n'a pu être décelé que dans le cytoplasme. Son apparition tardive dans le noyau est vraisemblablement liée à des lésions nucléaires, liées elles-mêmes à la dégénérescence des cellules.

SUMMARY

POLIOMYELITIC ANTIGEN DURING THE INTRACELLULAR DEVELOPMENT OF VIRUS.

1° Our observations confirm the granular or diffuse state of the antigen of poliomyelitis virus during the development of the cellular infection.

2° There is an early appearance of the antigen : already 1 hour after infection, the antigen can be detected in 10 p. 100 of the cells.

3° Until the 5th hour after infection the antigen has been

detected only in the cytoplasm. Its late appearance in the nucleus is probably bound to nuclear lesions resulting from the degeneration of the cells.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COONS (A. H.) et WELLER (T. H.), cités dans *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **86**, 789.
- [2] BUCKLEY (S. M.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1956, **5**, 388.
- [3] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *Ann. New York Acad. Sci.*, 1955, **61**, 790.
- [4] EAGLE (H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **89**, 362.
- [5] REISSIG (H.), HOWES (D. W.) et MELNICK (J. L.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 289.
- [6] KAPLAN (A.) et MELNICK (J. L.). *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 91.
- [7] DULBECCO (R.). *Ciba Foundation Symposium. The nature of Viruses*, 1957, 147.
- [8] SABIN (A. S.) et WARD (R.). *J. exp. Med.*, 1941, **73**, 757.
- [9] BODIAN (D.). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1948, **83**, 1.

ÉTUDE DE LA VIRULENCE DES CENTRES NERVEUX DE PORCELETS INOCULÉS DE VIRUS DE TESCHEN (SOUCHE MALGACHE)

par G. BUCK et H. SERRES (*)

(*Laboratoire Central de l'Elevage,
Tananarive, Madagascar*)

L'extension de la maladie de Teschen à Madagascar au cours des dernières années a contraint le Service de l'Elevage à produire des quantités sans cesse croissantes de vaccin, susceptibles de protéger le cheptel porcin contre cette redoutable affection.

Jusqu'à l'heure actuelle, malgré quelques essais de multiplication du virus en culture de tissus par Larski [1], les seules sources importantes de virus demeurent les centres nerveux de porcelets inoculés. La méthode est onéreuse, et le problème de la récolte de ces centres nerveux, au moment où ils renferment le maximum de virus, présente une double importance : immunologique et économique.

Doit-on effectuer une récolte précoce, en suivant les conseils généraux exprimés par les professeurs Lépine et Sohier [2] : « On saurait trop insister sur la nécessité d'opérer aussi précocelement que possible après le début de la maladie. Les ultraviruses, souvent décelables au cours de la période d'incubation, présentent leur maximum de développement et de diffusion dans l'organisme pendant l'invasion, puis tendent à devenir plus rares dès l'apparition des premiers signes cliniques, à telle enseigne qu'il est souvent impossible de les déceler à la phase d'état de la maladie. »

Doit-on plutôt laisser évoluer la maladie comme le préconise le professeur Verge [3] : « Si l'infection expérimentale réalisée est sûrement mortelle, il peut y avoir intérêt à sacrifier l'animal à la période agonique (rage du lapin, maladie de Carré chez le furet). »

Ou bien encore doit-on laisser évoluer jusqu'à la mort ?

D'autres que nous et avant nous se sont posé la question, et y ont répondu diversement, peut-être à cause de l'absence d'une

(*) Manuscrit reçu le 21 mars 1957.

expérimentation suffisamment large. Certains auteurs se sont contentés d'effectuer un titrage du virus, sans s'attacher autre mesure à la phase précise du prélèvement. C'est ainsi que Hecke [4] évalue la dose minima mortelle habituelle à 1/1 000 avec des maxima à 1/10 000 ; pour Kodrnja [5] cette même D. M. M. se situe aux environs de 1/2 000 à 1/3 000 ; Horstmann [6] affirme que l'infection peut être encore obtenue avec des dilutions de 10^{-4} de centres nerveux virulents. Enfin, Nani, Scatozza et Tiecco [7], utilisant la méthode de calcul de la DL50 de Reed et Muench [8], obtiennent $DL50 = 10^{-3,2}$.

Pour ce qui est de la phase précise du prélèvement, Fortner et Langner [9] préconisent une récolte très précoce, car le virus, selon eux, disparaît des centres nerveux dès le cinquième jour de la maladie. Elek et Kertay [10] disent avoir obtenu un vaccin efficace en prélevant les cerveaux tout au début de la maladie, lorsque les signes nerveux commencent à apparaître. Pilet et Verge [11] paraissent se rallier à ce point de vue, quoique leur opinion soit plus nuancée. Au contraire, Traub [12], préparant son vaccin aluminé formolé, utilise des cerveaux prélevés à la phase d'état ; et Weidlich [13] affirme que le cerveau est plus riche en virus lorsque l'animal est nettement paralysé.

Jusqu'en 1955, pour la fabrication du vaccin au Laboratoire Central de l'Elevage, les porcs étaient sacrifiés d'une manière assez précoce, dès l'apparition des premiers signes paralytiques. Cependant, deux faits d'observation nous amenèrent à reconsidérer la question. C'est d'abord le nombre d'échecs, un peu élevé, de la vaccination en brousse, qui furent observés lorsque la production fut augmentée de 7 000 à 25 000 doses par an. Le pourcentage de ces échecs demeura cependant faible, mais les propriétaires d'animaux surent bien y mettre l'accent. D'autre part, nous avons été frappés par le fait suivant : des différents points de Madagascar nous parvenaient des fragments de centres nerveux de porcs ayant succombé, pour confirmation du diagnostic de maladie de Teschen. Malgré un voyage parfois long (huit jours), dans des conditions loin de l'idéal (soit en glycérine à 50 p. 100, soit simplement en flacon stérile, à la température ordinaire), ces fragments se montraient assez régulièrement virulents, parfois jusqu'à la dilution 10^{-2} . La disparition du virus n'était donc pas aussi précoce que nous l'avions cru jusque-là.

Ces raisons nous poussèrent à entreprendre des titrages de la virulence des centres nerveux au cours des différentes phases de la maladie. Nous nous sommes placés à cinq « moments » de l'évolution :

I. L'animal présente une très forte hyperthermie (40-41°), mais ne montre pas encore de troubles nerveux et trotte normalement lorsqu'on l'effraie.

II. Le porc, toujours en hyperthermie ($39^{\circ}5-40^{\circ}$), présente une démarche anormale, vacille et peut tomber lorsqu'on l'oblige à courir.

III. Le porc, toujours en hyperthermie ($39^{\circ}5-40^{\circ}$), est très nettement paralysé ; il essaie de se relever sans y parvenir, il effectue des mouvements de pédalage.

IV. L'animal est couché sur le flanc, quasi immobile, avec des tremblements de la tête, ou du mâchonnement, ou du nystagmus, signant les lésions cérébrales. Sa température qui s'est abaissée devient nettement hypothermique (37° , voire moins) ; il va mourir.

V. Le porc vient de mourir, après une maladie classique ayant évolué en trois à cinq jours.

Vingt-cinq porcelets Large-White, pesant de 10 à 20 kg, ont été inoculés par voie intracérébrale avec 10^4 DL50 (souche locale Sice particulièrement virulente après dix passages par cerveau de porc). Les centres nerveux (cerveau, cervelet, bulbe, moelle) de cinq de ces porcelets ont été récoltés à la phase I. Ils ont été broyés au « Turmix », en eau distillée, à 14 000 t/mn pendant deux minutes, puis mélangés. Pareille opération a été réalisée avec cinq porcs pour chacune des phases évolutives précédemment définies. Nous avons donc obtenu cinq mélanges représentant chacun une phase, avec lesquels nous avons réalisé des titrages selon la méthode du calcul de la DL50 de Reed et Muench.

Avec chaque mélange ont été effectuées les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et lorsque cela fut nécessaire 10^{-7} . Les dilutions ont été inoculées par voie intracérébrale à des porcelets Large-White pesant de 8 à 20 kg, répartis en cinq lots équivalents. La dose inoculée est de 0,25 ml, car il est difficile d'inoculer davantage sans risque de voir ressortir une partie de l'inoculat par l'orifice de trépanation. Les porcs ont donc reçu : $10^{-1.6}$, $10^{-2.6}$, $10^{-3.6}$, etc. grammes de substance virulente. Trois animaux ont été inoculés par dilution pour chaque lot. L'expérimentation que nous allons décrire a mis en jeu l'inoculation de 93 porcelets.

Ont été considérés comme morts de maladie de Teschen les porcs ayant présenté une maladie classique, et dont les coupes de moelle lombaire montraient des lésions typiques (péritémore, dégénérescence des neurones, nodules d'infiltration, méningite).

Tous les survivants ont été réinoculés après trente-cinq jours, avec 10^4 DL50, afin de vérifier qu'il n'y avait pas de résistant naturel. Tous les survivants ont succombé à cette épreuve (la résistance naturelle est très rare à Madagascar sur les porcs de race pure, alors qu'elle est fréquente sur les porcs autochtones, ce qui en limite l'emploi au cours des expériences).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Centres nerveux récoltés à la phase I.

| | m | v | M | V | % | |
|-------------|---|---|---|---|-----|--------------------|
| $10^{-1,6}$ | 3 | 0 | 3 | 0 | 100 | |
| $10^{-2,6}$ | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | $DL50 = 10^{-2,1}$ |
| $10^{-3,6}$ | 0 | 3 | 0 | 6 | 0 | |

Centres nerveux récoltés à la phase II.

| | m | v | M | V | % | |
|-------------|---|---|----|---|-----|---------------------|
| $10^{-1,6}$ | 3 | 0 | 10 | 0 | 100 | |
| $10^{-2,6}$ | 3 | 0 | 7 | 0 | 100 | $DL50 = 10^{-4,35}$ |
| $10^{-3,6}$ | 3 | 0 | 4 | 0 | 100 | |
| $10^{-4,6}$ | 1 | 2 | 1 | 2 | 33 | |
| $10^{-5,6}$ | 0 | 3 | 0 | 5 | 0 | |

Centres nerveux récoltés à la phase III.

| | m | v | M | V | % | |
|-------------|---|---|----|---|-----|--------------------|
| $10^{-1,6}$ | 3 | 0 | 16 | 0 | 100 | |
| $10^{-2,6}$ | 3 | 0 | 13 | 0 | 100 | |
| $10^{-3,6}$ | 3 | 0 | 10 | 0 | 100 | $DL50 = 10^{-6,6}$ |
| $10^{-4,6}$ | 3 | 0 | 7 | 0 | 100 | |
| $10^{-5,6}$ | 2 | 1 | 4 | 1 | 80 | |
| $10^{-6,6}$ | 2 | 1 | 2 | 2 | 50 | |
| $10^{-7,6}$ | 0 | 3 | 0 | 5 | 0 | |

Centres nerveux récoltés à la phase IV.

| | m | v | M | V | % | |
|-------------|---|---|----|---|-----|--------------------|
| $10^{-1,6}$ | 3 | 0 | 13 | 0 | 100 | |
| $10^{-2,6}$ | 3 | 0 | 10 | 0 | 100 | $DL50 = 10^{-5,6}$ |
| $10^{-3,6}$ | 3 | 0 | 7 | 0 | 100 | |
| $10^{-4,6}$ | 3 | 0 | 4 | 0 | 100 | |
| $10^{-5,6}$ | 1 | 2 | 1 | 2 | 33 | |
| $10^{-6,6}$ | 0 | 3 | 0 | 5 | 0 | |

Centres nerveux récoltés à la phase V.

| | m | v | M | V | % | |
|-------------|---|---|----|---|-----|--------------------|
| $10^{-1,6}$ | 3 | 0 | 13 | 0 | 100 | |
| $10^{-2,6}$ | 3 | 0 | 10 | 0 | 100 | $DL50 = 10^{-5,6}$ |
| $10^{-3,6}$ | 2 | 1 | 7 | 1 | 87 | |
| $10^{-4,6}$ | 3 | 0 | 5 | 1 | 83 | |
| $10^{-5,6}$ | 2 | 1 | 2 | 2 | 50 | |
| $10^{-6,6}$ | 0 | 3 | 0 | 5 | 0 | |

Les résultats expérimentaux confirment nos doutes et permettent de conclure :

a) La virulence des centres nerveux est faible tout au début de la maladie ;

b) Elle est maxima lorsque le porc est nettement paralysé, juste avant que sa température ne s'abaisse ;

c) Elle diminue ensuite, mais relativement peu pendant la phase terminale et la mort de l'animal. Les résultats très voisins obtenus aux périodes IV et V (séparées seulement par les quelques instants de la mort) le montrent nettement.

La conclusion pratique, c'est qu'on n'a pas intérêt à sacrifier les porcs trop tôt, de peur de perdre du virus. On doit attendre une paralysie nette ; et si, d'aventure, une évolution très rapide surprend le sacrificateur et l'oblige à prélever en période hypothermique, la perte n'est pas aussi considérable qu'on avait pu le craindre.

★★

Nous avons complété l'expérimentation par l'application des principes que les titrages nous ont permis de dégager.

Des vaccins ont été préparés avec :

- a) Un mélange de centres nerveux prélevés à la phase I.
- b) Un mélange de centres nerveux prélevés à la phase III.
- c) Un mélange de centres nerveux prélevés à la phase IV.

Ces vaccins sont constitués par un broyat au « Turmix » en eau distillée, additionné de gel d'alumine et d'acide phénique de manière à contenir en fin de préparation 10 p. 100 de matière virulente, 1 p. 100 d'alumine, 0,5 p. 100 de phénol. La vaccination comporte deux injections sous-cutanées de 10 ml à quinze jours d'intervalle. Les porcs ont été éprouvés avec 10^4 DL50 en injection intracérébrale, trois semaines après la deuxième vaccination.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

| | VACCINÉS | RÉSISTANTS | MORTS | % MORTS |
|----------------|----------|------------|-------|---------|
| Phase I | 7 | 5 | 2 | 28 |
| Phase III | 7 | 7 | 0 | 0 |
| Phase IV | 6 | 6 | 0 | 0 |

Ces résultats corroborent les précédents. Le vaccin préparé à partir de récoltes précoces s'est montré inférieur à ceux préparés avec des récoltes plus tardives, même en période hypothermique prémortelle.

★★

LA MALADIE DE TESCHEN ET LE PROBLÈME DES NEURO-INFECTI0NS AUTOSTÉRILISABLES.

Depuis que Levaditi et ses collaborateurs [14] ont créé le terme devenu classique de neuro-infections autostérilisables, on a pu

classer dans ce groupe de nombreuses viroses neurotropes et dermo-neurotropes.

Nous avons vu que Fortner et Langner ont constaté des stérilisations cérébrales après cinq jours de maladie ; de même, Schaffer et Heynen [45] ont mis en évidence des autostérilisations dans la maladie de Teschen.

Au cours de notre expérimentation (phase V), nous avons plutôt constaté que les centres nerveux de porcs morts récemment contenait encore des quantités très importantes de virus. Par ailleurs, il nous a été possible d'observer un cas particulier : c'est celui d'un porcelet inoculé normalement, qui a présenté des symptômes classiques après neuf jours d'incubation.

Arrivé à la période terminale au cinquième jour de la maladie, sa température s'est abaissée à 38°, mais il n'est pas mort. Il est resté totalement paralysé, couché sur le flanc, pendant douze jours. Il est devenu étique, avec des escarres de décubitus volumineuses. Il est mort de misère physiologique et de troubles circulatoires (hypostase), bien plus sûrement que de l'infection virale. Ses centres nerveux ont été prélevés, et un titrage fait avec calcul de la DL50 (même technique que plus haut).

| | m | v | M | V | % | |
|--------------------|---|---|---|----|----|---|
| 10 ^{-1,6} | 1 | 2 | 3 | 2 | 60 | |
| 10 ^{-2,6} | 1 | 2 | 2 | 4 | 33 | DL50 = 10 ^{-1,97} ≈ 10 ⁻² |
| 10 ^{-3,6} | 0 | 3 | 1 | 7 | 13 | |
| 10 ^{-4,6} | 1 | 2 | 1 | 9 | 10 | |
| 10 ^{-5,6} | 0 | 3 | 0 | 12 | 0 | |

Malgré l'agonie extrêmement longue, les centres nerveux présentaient encore une virulence non négligeable. Nous conclurons en disant que les autostérilisations de la maladie de Teschen sont certainement possibles, mais qu'elles nous paraissent être d'une extrême rareté, tout au moins en ce qui concerne l'infection malgache.

RÉSUMÉ.

Des titrages de virus de Teschen ont été réalisés à partir des centres nerveux de porcelets inoculés avec une souche locale, et sacrifiés à différents stades de la maladie. Au début, il y a peu de virus ; le maximum est observé lorsque les paralysies sont nettes (animal incapable de se relever), alors qu'il y a encore hyperthermie. On atteint ainsi 10^{6,6} DL50 par gramme de substance virulente. Le titre baisse relativement peu au cours de la phase terminale.

L'autostérilisation paraît exceptionnelle avec les souches malgaches. Des vaccinations expérimentales ont montré qu'il n'y a pas intérêt à sacrifier trop tôt les animaux.

SUMMARY

STUDIES ON THE VIRULENCE OF CNS OF YOUNG PIGS INOCULATED
WITH TESCHEN DISEASE VIRUS (MADAGASCAR STRAIN).

Titrations of Teschen disease virus have been carried out on the central nervous system of young pigs inoculated with a local strain and killed at various stages of the disease. At the beginning of the disease the CNS does not contain much virus; the maximum is found when the paralysis is fully established, when the animal is unable to stand up and is still hyperthermic. The DL50 is then $10^{6.6}$ per gram of infected nervous substance. This titer sinks but little during the terminal phase.

With the Madagascar strains, autosterilization seems to be exceptional.

Vaccines prepared with infected CNS taken at the beginning of the disease have proved less effective than those prepared with brains from a later stage (even hypothermic pre-agonic stage).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LARSKI. *Med. Weter.*, 1955, **41**, 589.
- [2] LÉPINE et SOHIER. *Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à ultravirüs*, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1954, p. 8.
- [3] VERGE, in HAUDUROY. *Problèmes actuels de virologie*, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1954, p. 141.
- [4] HECKE. *Wien. tier. Wschr.*, 1951, **38**, 147.
- [5] KODRNJA. *Bull. Off. Int. Epizooties*, 1952, **38**, 117.
- [6] HORSTMANN. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 379.
- [7] NANI, SCATOZZA et TIECCO. *Boll. Ist. sier. milan.*, 1956, n° 5-6, 314.
- [8] REED et MUENCH. *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [9] FORTNER et LANGNER, cités par Pilet et VERGE, réf. [11].
- [10] ELEK et KERTAY. *Acta Veter. Acad. Sci. Hung.*, 1951, **1**, 367.
- [11] PILET et VERGE. *Bull. Off. Int. Epizooties*, 1951, **35**, 337.
- [12] TRAUB. *Arch. Tierh.*, 1941, **77**, 52.
- [13] WEIDLICH. *Berl. Münch. tier. Wschr.*, 1939, **35**, 549.
- [14] LEVADITI, SANCHIS-BAYARRI et SCHOEN. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 911.
- [15] SCHAFER et HEYNEN. *Zbl. Bakt.*, 1941, **147**, 25.

CANDIDOSE DIGESTIVE CHEZ LE LAPIN

par E. DROUHET et G. SIMONNET (*).

(Institut Pasteur, Service de Mycologie et Physiologie Végétale)

La fréquence des infections mycosiques, en particulier des complications post-antibiotiques dues aux *Candida*, a rendu nécessaire la recherche de produits antifongiques actifs. Mais l'évaluation de l'activité *in vivo* d'un antifongique se heurte à de nombreuses difficultés ; entre autres il est difficile de reproduire chez l'animal une infection semblable à l'infection humaine naturelle. Le lapin est très sensible à l'inoculation de *C. albicans* par voie intraveineuse, mais l'infection expérimentale mortelle obtenue ne correspond pas à l'infection habituellement rencontrée en clinique humaine : dans ce dernier cas, où la porte d'entrée est la bouche, la localisation la plus fréquente est le tractus digestif.

Chez le lapin, une infestation localisée du tube digestif peut être obtenue par inoculation intragastrique de *C. albicans* ; cette infestation n'est pas accompagnée de manifestations cliniques évidentes. Nous avons préconisé cette mycose expérimentale au cours des essais thérapeutiques sur la nystatine [1].

Récemment, Hazen et Brown [2] ont obtenu la reproduction expérimentale des lésions de muguet chez le lapin inoculé par voie buccale avec une suspension de *C. albicans* en traitant préalablement les animaux par la chlortétracycline par voie buccale.

Dans ce travail nous apportons quelques observations concernant la candidose digestive du lapin et les modifications de la flore fongique intestinale survenant après l'administration des antibiotiques antibactériens.

Ces observations peuvent permettre d'évaluer l'activité antifongique de produits divers. L'antifongique éprouvé dans ce travail est un complexe résine polyamine-caprylate qui libère dans le tube digestif le caprylate dont les propriétés antifongiques ont été signalées par divers auteurs [3, 4].

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 avril 1957.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Animaux : Les lapins utilisés dans ces expériences sont des jeunes lapins pesant environ 3 000 g, soumis au régime habituel de nourriture (betterave et fourrage vert).

Souches : La souche de *Candida albicans* utilisée pour l'infection expérimentale des expériences I et II est la souche Baz., isolée des selles d'un enfant atteint de muguet généralisé étendu à tout le tractus digestif. Des essais pour l'obtention de muguet expérimental ont été également effectués avec 3 autres souches de *Candida albicans* d'origine humaine.

L'activité des antifongiques est évaluée sur la souche 479 B de *C. albicans* et sur 2 souches de *Geotrichum* : souche K isolée des selles d'un adulte présentant une géotrichose intestinale et la souche L 5, isolée des matières fécales d'un lapin.

Mode d'infection : Dans l'infection par voie buccale, 1 cm³ d'une suspension de 5 millions de levures de *C. albicans* est administrée à l'aide d'un compte-gouttes une fois par jour, pendant cinq jours consécutifs.

Pour l'infection par voie intragastrique, une suspension contenant 5 millions de levures dans 5 cm³ est administrée à l'aide d'une sonde en caoutchouc. Cette inoculation est également faite une fois par jour pendant cinq jours consécutifs.

Evaluation du nombre d'éléments fongiques dans les matières fécales et dans la bouche.

Environ 500 mg de matières fécales recueillies chaque matin sont dilacérés dans 5 cm³ d'eau physiologique contenant de la pénicilline (1 000 U. O./cm³), de la streptomycine (1 000 µg/cm³) et de la chlorotétracycline [auréomycine] (200 µg/cm³). Après une heure de contact, des dilutions successives de 10 en 10 de cette suspension primitive sont mélangées à la gélose d'isolement de Sabouraud coulée dans des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre. A cause de la présence, dans les matières fécales, de nombreux champignons saprophytes comme *Aspergillus* et *Mucor*, il est nécessaire d'ajouter, en plus du mélange pénicilline (100 U. O./cm³)-streptomycine (100 µg/cm³)-auréomycine (50 µg/cm³), de l'actidione (0,5 g p. 1 000) qui inhibe ces champignons sans agir sur *Candida* et *Geotrichum*.

Les matières fécales qui ne sont pas préparées immédiatement après la récolte sont gardées sans inconvénient à — 20° et décongelées au moment de la préparation.

Les prélèvements buccaux sont effectués à l'aide d'écouvillons stériles qui sont utilisés pour l'ensemencement en surface du même milieu.

On compte les colonies après quarante-huit heures d'incubation à 30°.

Antifongique : Le produit étudié est un complexe de résine (polyéthylène polyamine méthylène) avec du caprylate. Cette résine-caprylate contient 50 p. 100 de caprylate qui en constitue la partie antifongique active.

Une étude préliminaire comparative *in vitro* de la résine-caprylate et du caprylate de sodium pur nous a montré une action fongistatique

sur les souches de *Candida albicans* et de *Geotrichum*. Les concentrations fongistatiques de la résine-caprylate sont en fonction du caprylate contenu dans le produit dans la proportion de 50 p. 100.

La croissance de *Candida albicans* est inhibée pendant vingt-quatre heures par la concentration 1/8 000, pendant quarante-huit heures par la concentration 1/6 000 et pendant cinq jours par la concentration 1/4 000. *Geotrichum* est inhibé par des concentrations supérieures à celles indiquées. La résine-caprylate et le caprylate de sodium ont également une action fongicide sur *C. albicans* à la concentration de caprylate 1/50 pour un temps de contact compris entre cinq et vingt-quatre heures.

I. — CANDIDOSE DIGESTIVE PAR INOCULATION BUCCALE.

Expérimentation. La première expérience porte sur 16 lapins divisés en 5 lots (voir fig. 1). Les lots I, II, III et IV sont infectés par voie orale avec une suspension de *C. albicans* administrée pendant trois jours consécutifs ; après un jour de repos, l'inoculation orale est répétée les deux jours suivants. Les lots III et IV sont soumis pendant deux jours avant l'inoculation à un traitement à la chlortétracycline, administrée également par voie buccale en deux prises de 100 mg ; ensuite, pendant trois jours consécutifs, la chlortétracycline est administrée en même temps que l'inoculum de *C. albicans*.

Après la dernière inoculation, les lapins des lots II et IV sont traités par 200 mg de résine-caprylate administrée à deux reprises, matin et soir, pendant neuf jours. Un lot de lapins (lot V) non inoculés, mais soumis au même traitement antifongique, constitue un contrôle de l'activité de la résine-caprylate seule.

Le protocole d'expérimentation et les résultats obtenus concernant l'abondance et l'évolution de la flore fongique des matières fécales sont résumés dans la figure I.

Résultats. L'administration de chlortétracycline avant l'inoculation de *C. albicans* est nécessaire pour produire une infestation du tube digestif du lapin. Sans chlortétracycline, l'inoculation de *C. albicans* par la bouche ne permet pas de retrouver d'une façon constante et appréciable les *Candida* dans la bouche et les selles. Après le traitement préalable par cet antibiotique, l'inoculation par voie buccale de *C. albicans* produit : 1° une infestation des voies digestives supérieures décelable par la présence de *Candida* dans les prélèvements de bouche et d'œsophage, et 2° une faible infestation intestinale décelable par la présence constante de *C. albicans* dans les matières fécales.

Il résulte de cette expérience, comme d'autres expériences ultérieures semblables, que nous n'avons pu obtenir chez le lapin des lésions cliniques de muguet buccal. L'examen des coupes de la langue des lapins infectés par voie buccale après traitement

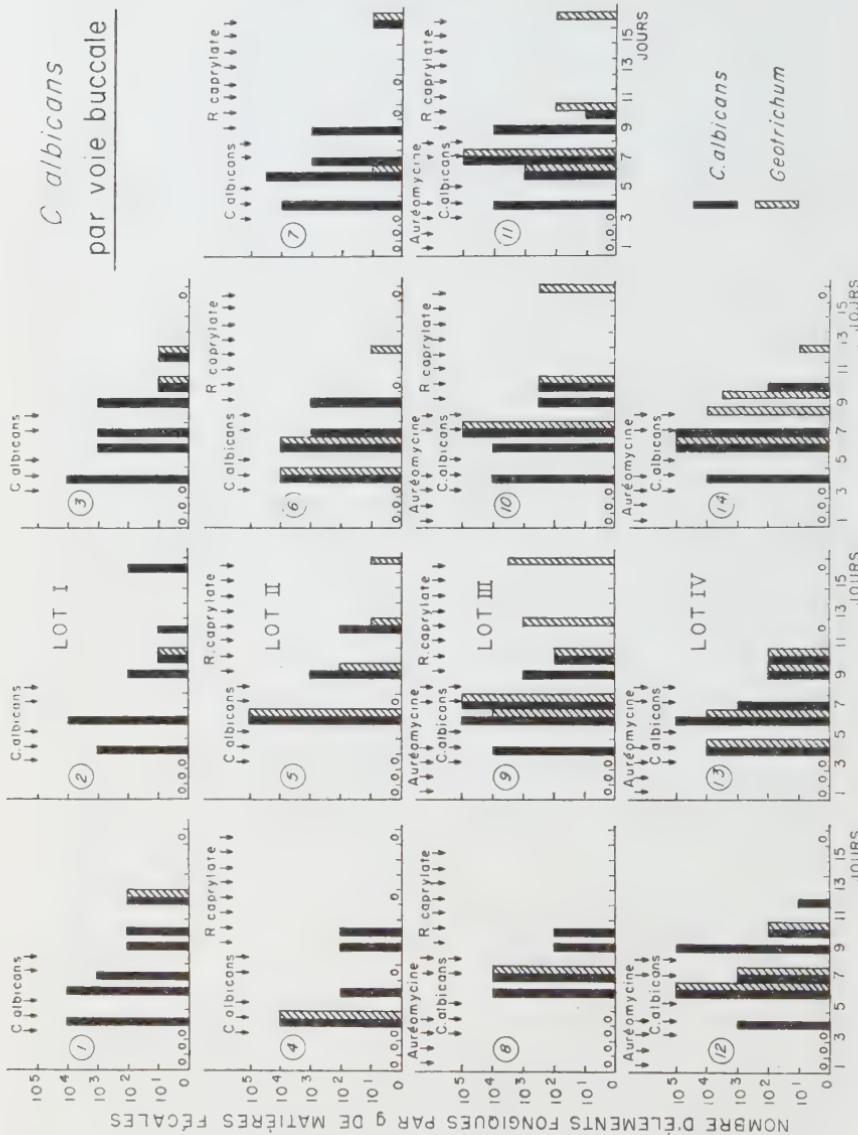


FIG. 1. — Evolution de la flore fongique intestinale du lapin au cours de l'infection à *Candida albicans* inoculé par voie buccale.

préalable par le chlortétracycline montre la présence de levures et de filaments dans les papilles de la couche dermique, malgré l'absence de lésions cliniques évidentes.

Chez les lapins soumis au traitement par la chlortétracycline, on observe dans les selles un important développement spontané de *Geotrichum*, champignons que l'on ne retrouve généralement qu'en faible quantité et d'une façon inconstante dans l'intestin du lapin. Cette apparition de *Geotrichum* en grande quantité rend difficile l'évaluation des *Candida* qui se développent un peu moins vite que les *Geotrichum*. L'infection digestive à *C. albicans* obtenue par voie buccale ne s'est pas montrée assez importante pour évaluer avec précision l'efficacité de la résine-caprylate. Pour cette raison, on a eu recours dans les expériences suivantes à l'infection digestive par voie intragastrique.

La résine-caprylate ne modifie pas le nombre de *C. albicans* de la muqueuse buccale des lapins infectés. Il en est de même pour le caprylate de sodium (solution à 10 p. 100) employé en badigeonnage quotidien pendant une semaine.

II. — CANDIDOSE DIGESTIVE PAR VOIE INTRAGASTRIQUE.

Expérimentation. Afin d'obtenir une infestation intestinale plus importante, dans une deuxième expérience, 16 lapins sont soumis à un traitement préalable à la chlortétracycline (100 mg deux fois par jour par la bouche) pendant deux jours et inoculés par voie intragastrique avec une suspension de *C. albicans* pendant les trois jours suivants ; le traitement à la chlortétracycline est poursuivi pendant les trois jours d'inoculation.

Les 16 lapins sont séparés en trois lots (VI, VII, VIII).

1^o Le lot VI ne subit pas de traitement antifongique.

2^o L'action prophylactique de l'antifongique est étudiée dans le lot VII : la résine-caprylate est administrée par voie buccale (100 mg trois fois par jour) pendant les six jours qui ont suivi l'inoculation jusqu'à la fin de l'expérience.

3^o Les lapins du lot VIII sont traités par la résine-caprylate (100 mg trois fois par jour) pendant les six jours qui ont suivi la dernière inoculation.

Résultats. Les résultats concernant le nombre de *Candida* par gramme de matières fécales d'animal sont notés dans la figure 2, dont on peut tirer les remarques suivantes :

1^o Le lot témoin VI présente une importante infestation du tube digestif traduit par un nombre beaucoup plus élevé de *C. albicans* par gramme de matières fécales que dans l'expérience d'inoculation par voie buccale. La flore fongique à *Candida* prédomine nettement dans cette expérience sur la flore à *Geotrichum*. Le nombre de *Candida* est compris entre 10⁴ et 10⁶ levures par

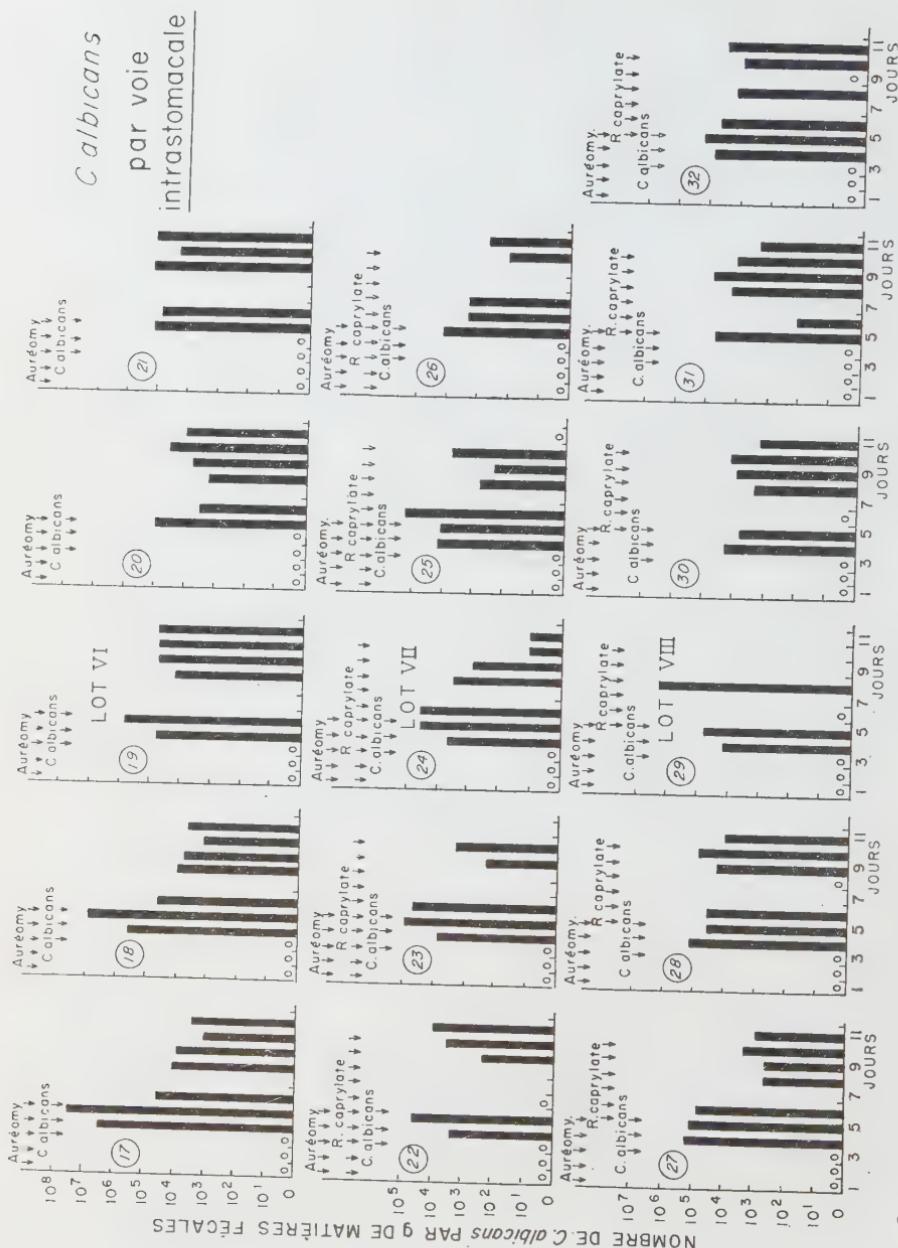


FIG. 2. — Evolution du nombre de *Candida* dans les matières fécales de lapin au cours de l'infection à *Candida albicans* par inoculation intrastomacale.

gramme de matières fécales, tandis que le nombre de *Geotrichum* se situe, comme dans la première expérience, autour de 10^4 éléments fongiques par gramme de matière fécale.

2° La résine-caprylate a une action prophylactique certaine sur l'infection expérimentale du lapin, sans amener toutefois une stérilisation complète du tube digestif.

3° Une certaine réduction du nombre de *Candida* des matières fécales s'observe dans un lot traité après infection, mais dans une moindre proportion que pour le lot précédent.

Faisant la moyenne des *Candida* obtenus sur les prélèvements de matières fécales de chaque animal (entre 30 et 40 prélèvements), on remarque que pour le lot témoin on trouve en moyenne 1 537 000 levures par gramme de matières fécales de chaque prélèvement, pour le lot prophylactique (lot VII) 20 879 levures et pour le lot des traités (lot VIII) 110 858 levures, chiffres qui paraissent statistiquement significatifs.

DISCUSSION.

Malgré de nombreux essais nous n'avons pas pu reproduire chez le lapin les lésions cliniques de muguet obtenues par Hazen et Brown [2]. Toutefois, malgré l'absence de lésions cliniques manifestes, nous avons obtenu une infection inapparente décelable par des cultures positives de *Candida albicans* et par la présence de levures et de filaments mycéliens dans les papilles linguales des lapins infectés. Ce fait expérimental peut expliquer l'existence de cas de candidose digestive, même généralisée, sans lésions buccales membraneuses blanches caractéristiques, se manifestant seulement par des lésions érythémateuses peu évidentes. Les prélèvements buccaux se maintiennent positifs plus de dix jours après l'arrêt des doses buccales de *Candida albicans*, ce qui est suffisant pour évaluer l'efficacité d'un agent antifongique local. Certaines conditions de nos expériences (âge et régime alimentaire des animaux, souches utilisées) pouvaient expliquer notre échec dans la reproduction expérimentale du muguet clinique.

Au cours des divers essais nous avons utilisé des lapins très jeunes, de 2 à 3 mois (pesant 1 000 à 1 500 g), ainsi que des lapins plus âgés pesant 3 500 et 4 000 g, sans pouvoir reproduire les lésions cliniques de muguet (1). Quatre souches différentes, dont deux provenaient de malades atteints de muguet généralisé, ont été essayées avec les mêmes résultats. Une explication probable de cet échec pourrait être fournie par la nourriture des lapins,

(1) Après la rédaction de cette note nous avons pris connaissance du travail de P. Negroni (*Ann. Parasit.*, 1932, **10**, 276) qui a réussi à reproduire un muguet lingual et œsophagien chez des lapins nouveau-nés d'une semaine par inoculation buccale de *C. albicans*.

différente d'un laboratoire à l'autre. A ce sujet, rappelons l'observation récente de Rimbaud et coll. [5], qui obtiennent chez le chien une candidose digestive importante seulement avec un régime hyperglucidique. L'administration, préalable à l'infection, de chlortétracycline favorise indiscutablement la pullulation sur la muqueuse buccale et intestinale des *Candida* inoculés, ainsi que des *Geotrichum* qui se trouvent à l'état saprophytique dans l'intestin des lapins. La présence de *Geotrichum* comme saprophyte de l'intestin des lapins est signalée par Cochet [6]. Habituellement, chez les lapins normaux, la proportion de *Geotrichum* dans les crottes est faible ; leur présence est inconstante. Dans nos expériences les lapins soumis à la chlortétracycline ont présenté un développement important des *Geotrichum* ; dans la première expérience, ce développement a beaucoup gêné la numération des colonies de *Candida* ; dans la deuxième expérience (infection par voie intragastrique), le nombre des *Candida* a été plus important, dépassant de beaucoup 10^4 par gramme de matières fécales. Les *Geotrichum* se sont maintenus à un taux d'environ 10^4 et n'ont pas gêné la numération des *Candida*.

De l'expérience II il résulte que l'inoculation de *Candida albicans* par voie intragastrique permet une infestation intestinale beaucoup plus importante que celle obtenue par voie buccale. Cette voie d'administration est utile pour l'évaluation de la valeur antifongique d'une drogue dans la candidose digestive du lapin, permettant un taux élevé et constant des levures dans les matières fécales pendant au moins dix jours. L'antifongique étudié dans ce travail est le caprylate de sodium administré sous la forme d'un complexe résine-caprylate qui libère dans l'intestin le composé antifongique [4]. L'administration prophylactique de ce complexe s'est montré plus efficace que l'administration après l'infection ; mais la stérilisation totale n'est pas obtenue même après dix jours de traitement intense. L'application d'une solution de caprylate de sodium à 10 p. 100 dans l'infection buccale du lapin à *C. albicans* ne nous a pas permis de stériliser la muqueuse buccale malgré l'affirmation de certains auteurs qui signalent une activité thérapeutique du caprylate de sodium sur le muguet du nouveau-né [3].

CONCLUSION ET RÉSUMÉ.

Après un traitement préalable par la chlortétracycline, l'inoculation par voie buccale de *C. albicans* produit :

1° Une infestation des voies digestives supérieures décelable par la présence constante et prolongée de *Candida* dans les prélèvements de bouche et d'œsophage ;

2° Une faible infestation intestinale décelable par la présence de *C. albicans* dans les matières fécales.

L'examen des coupes de la langue des lapins infectés par voie buccale après traitement préalable par la chlortétracycline montre la présence de levures et de filaments dans les papilles de la couche dermique malgré l'absence de lésions cliniques évidentes.

Chez les lapins soumis au traitement par la chlortétracycline, on observe dans les selles un important développement spontané de *Geotrichum*. L'inoculation intragastrique de *C. albicans* provoque, dans le tube digestif des lapins infectés, un développement de *Candida* suffisamment élevé et durable pour permettre l'évaluation du pouvoir antifongique *in vivo* du produit à l'étude (résine-caprylate).

SUMMARY

EXPERIMENTAL INTESTINAL DIGESTIVE INFECTION WITH *Candida albicans* IN THE RABBIT.

Rabbits have been treated with chlortetracycline. Subsequently they were orally infected with *C. albicans*. The following observations have been made :

1° An infestation of the upper digestive tract was demonstrated by the constant and continuous presence of *C. albicans* in mucus from mouth and oesophagus.

2° A slight intestinal infection was demonstrated by the presence of *C. albicans* in the feces.

The histological examination of a section of the tongue of these rabbits showed the presence of yeasts and filaments in the lingual papillae notwithstanding the absence of clinical lesions.

The intragastric inoculation of *C. albicans* produced a sufficiently abundant and durable development of *C. albicans* in the feces, which enables the authors to evaluate the activity of an antifungal drug (resin-caprylate) *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DROUHET (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 298.
- [2] HAZEN (E.) et BROWN (R.). In *Therapy of fungous disease, An International Symposium*, Little, Brown et C, Boston, 1955.
- [3] COHEN (R.) et PERSKI (M.). *Arch. Pediatr.*, 1951, **68**, 33.
- [4] SHIDLOVSKY (B. A.) et coll. *Antib. Ann.*, 1955-1956, p. 98.
- [5] RIMBAUD (P.), HARANT (H.), RIOUX (J.-A.) et CARON (J.). *Sem. Hôpitaux (Pathol. et Biol.)*, 1957, **5**, 1292.
- [6] COCHET (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 77. *Thèse, Fac. Sci., Lille*, 1940.

INFLUENCE DE LA NATURE ÉLECTROPHORÉTIQUE (GAMMA OU BÊTA GLOBULINE) DE L'ANTITOXINE ANTIDIPIHTÉRIQUE DE CHEVAL SUR LA FORME DE LA COURBE DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE

par E. H. RELYVELD et M. RAYNAUD (*)

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

L'antitoxine antidiptérique et l'antitoxine antitétanique chez le cheval hyperimmunisé peuvent être localisées soit dans les γ -globulines, soit dans les β -globulines [1]. Très souvent on observe, au cours de l'immunisation, une modification de cette localisation. D'abord associée aux γ -globulines au début, l'antitoxine est, en fin d'immunisation, associée uniquement ou de façon prédominante, à un constituant de dénomination variable selon les auteurs [2], mais de mobilité intermédiaire entre celle des γ -globulines et des β -globulines (constituant $\beta_2 = \gamma_1 = T$). Nous adopterons le terme de β_2 -globuline dans ce travail.

Nous avons montré récemment [3] que ce schéma classique, quoique correspondant souvent à la réalité, n'était pas absolu. Des variations souvent importantes peuvent être observées. Nous avons pu ainsi préparer, par immunisation avec des anatoxines diptériques purifiées, divers sérums de chevaux riches en antitoxine antidiptérique, cette dernière étant localisée de façon prédominante soit dans les γ , soit dans les β_2 -globulines.

Deux sérums particulièrement intéressants nous ont permis de préciser les caractères des antitoxines de type γ et des antitoxines de type β_2 . L'un, le n° 441, titrant 225 UF/ml, avec un rapport $L+/Lf = 1,89$, contenait des antitoxines de type β_2 et γ -globulines, ces dernières en proportions élevées pour un sérum de fin d'immunisation. L'autre, le n° 1451, de type classique très accentué, titrant 540 UF/ml, avec un rapport $L+/Lf = 0,89$, contenait presque uniquement des β_2 -antitoxines avec des traces seulement de γ -antitoxine.

Nous avons fractionné les deux sérums précédents par préci-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 mars 1957.

pitations répétées par le sulfate d'ammonium entre 0 et 0,33 de saturation d'une part, entre 0,33 et 0,50 d'autre part.

Nous avons établi les courbes de précipitation quantitative des sérums d'origine et des diverses fractions ainsi obtenues. Toutes les courbes ont été faites dans des conditions standard, voisines de celles utilisées par Pappenheimer et Robinson [4]. Les tubes contenaient sous le volume de 5 ml, 400 unités de flocculation d'antitoxine. La toxine utilisée était une toxine pure, d'activité spécifique égale à 3 000 UF/mg N [5], ne contenant qu'un seul antigène décelable par précipitation spécifique en gel et par immuno-électrophorèse [6]. Incubation : deux heures à 37°, puis

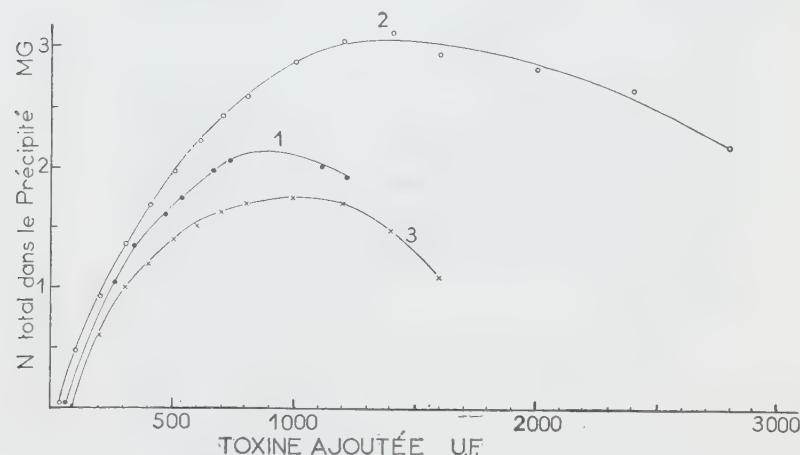


FIG. 1. — Courbes de précipitation quantitative : 1. Sérum 441 non fractionné ; 2. Fraction 1 du même sérum ; 3. Fraction 2 du même sérum.

deux jours à 0°. Centrifugation et lavages à 0°. Azote total par kjeldahlisation.

La figure 1 représente les courbes obtenues avec le sérum 441 et avec diverses fractions préparées à partir de ce même sérum.

Courbe 1 : sérum 441 non fractionné, $L_+/Lf = 1,89$.

Courbe 2 : fraction 1 (0-0,33 saturation en SO_4Am_2), très riche en γ -antitoxine, $L_+/Lf = 4,86$.

Courbe 3 : fraction 2 (0,33-0,50 saturation en SO_4Am_2) enrichie en β_2 -antitoxine, mais contenant encore une proportion élevée de γ -antitoxine, $L_+/Lf = 1,45$.

La figure 2 représente les courbes obtenues avec les antitoxines suivantes :

1^o Sérum 1451 (fin d'immunisation), très riche en β_2 -antitoxine, mais contenant encore une certaine proportion de γ -antitoxine. Rapport $L+/Lf = 0,89$ (courbe 1).

2^o Fraction obtenue à partir du sérum 1451 et privée presque complètement de γ -antitoxine par relargages répétés entre 0,33

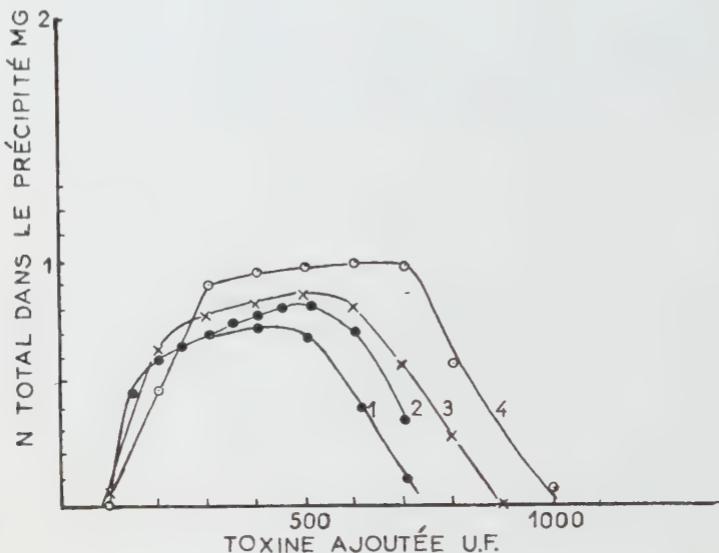


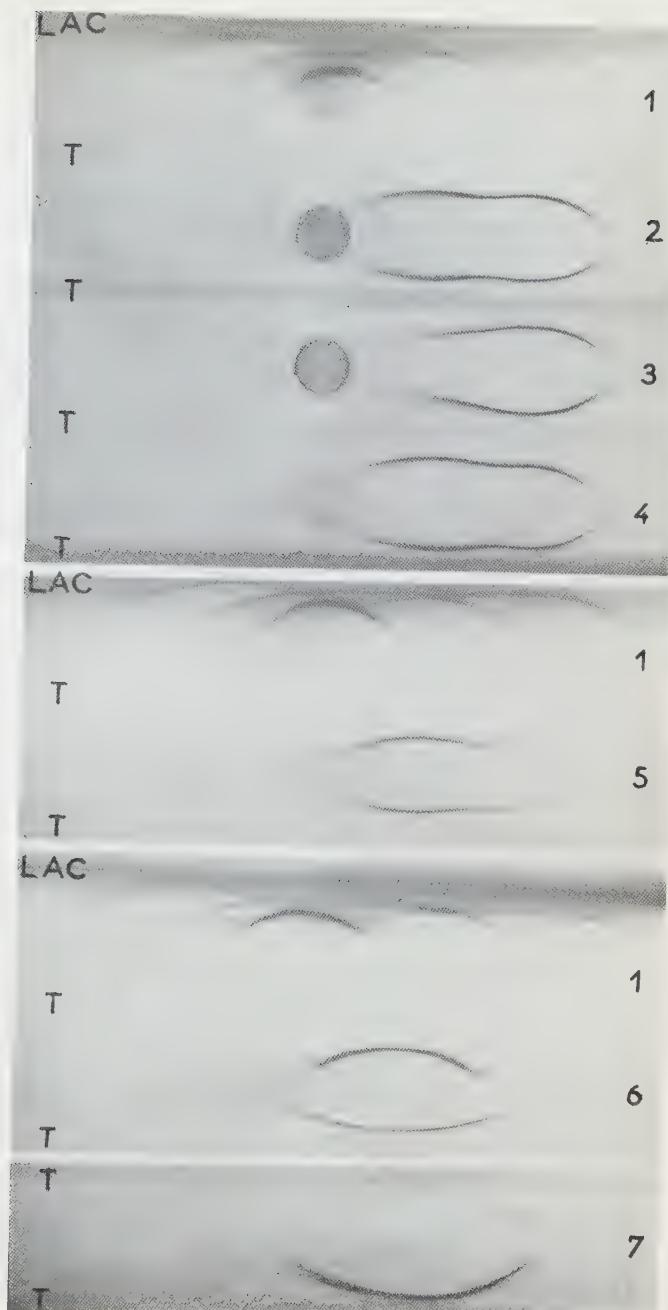
FIG. 2. — Courbes de précipitation quantitative : 1. Sérum 1451 fin d'immunisation ; 2. Fraction du même sérum (0,33-0,50 saturation SO_4Am_2) ; 3. Sérum étalon de flocculation ; 4. Sérum étalon antitoxique.

et 0,50 de saturation en SO_4Am_2 . Rapport $L+/Lf = 0,85$ (courbe 2).

3^o Sérum étalon de flocculation de Copenhague (1) [$L+/Lf = 1$] riche en β_2 -antitoxine, mais contenant une proportion non négligeable de γ -antitoxine (courbe 3).

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Immunoélectrophorèse de divers sérums et de leurs fractions : 1. Sérum de cheval normal ; 2. Sérum 441 non fractionné ; 3. Fraction 1 du même sérum ; 4. Fraction 2 du même sérum ; 5. Sérum étalon de flocculation ; 6. Sérum 1451 fin d'immunisation ; 7. Fraction 33-50 p. 100 du sérum 1451. Dans les rigoles : LAC : Sérum de lapin anti-cheval. T : Toxine diphtérique purifiée.



4° Sérum étalon international antitoxique de Copenhague (1), riche en β_2 -antitoxine, mais contenant une proportion non négligeable de γ -antitoxine (courbe 4).

On trouvera, sur la planche, les immunoélectrophorèses des sérum et des diverses fractions utilisées.

L'examen des courbes des figures 1 et 2 permet de formuler les propositions suivantes :

1° Les γ -antitoxines antidiphétériques de cheval donnent une courbe de précipitation quantitative dont la forme se rapproche de celle des anticorps de type lapin. On observe cependant une zone très réduite où le précipité spécifique est soluble dans un excès d'anticorps. Le taux maximum d'azote total précipitable est beaucoup plus élevé pour les γ -antitoxines que pour les β_2 -antitoxines. Le rapport $L+/Lf$ est très élevé. Il n'apparaît de toxine libre *dans le surnageant* que dans la région située après le point de précipitation maxima ; de même, on trouve du sérum libre jusqu'à ce point (titrage *in vivo*). Ce point est atteint pour un rapport antigène/anticorps beaucoup plus élevé que le rapport antigène/anticorps correspondant au mélange présentant la flocculation initiale (équivalence de flocculation). L'optimum de flocculation se trouve donc sur la courbe dans la zone d'excès très fort d'antitoxine.

2° La courbe dite de type « cheval classique » est donnée par tous les sérum contenant des β_2 -antitoxines, prédominantes ou associées à une proportion relativement faible de γ -antitoxines.

Diverses conséquences de ces faits nouveaux seront développées dans une publication ultérieure [7].

RÉSUMÉ.

La forme de la courbe de précipitation quantitative entre la toxine diphétique et l'antitoxine correspondante de cheval dépend de la nature électrophorétique de l'antitoxine. La forme *classique* avec zone d'équivalence rectiligne s'observe avec les sérum contenant une proportion élevée de β_2 -antitoxine. Les γ -antitoxines donnent une courbe arrondie, rappelant les courbes de type lapin avec solubilité très réduite du précipité spécifique dans la zone d'excès d'anticorps. Le rapport *in vivo/in vitro* des γ -globulines antitoxiques est beaucoup plus élevé que celui des β -globulines antitoxiques.

(1) Nous adressons tous nos remerciements au Dr O. Rostock, du Statens Serum Institut de Copenhague, qui nous a très aimablement fait parvenir les quantités élevées de sérum étalons nécessaires à ces expériences.

SUMMARY

INFLUENCE OF THE ELECTROPHORETIC NATURE (γ - OR β -GLOBULIN)
OF HORSE ANTI-DIPHTHERIA ANTITOXIN
ON THE QUANTITATIVE PRECIPITATION CURVE.

In hyperimmunized horses anti-diphtheria antitoxin is localized in the γ -globulins and in the β -globulins.

The aspect of the quantitative precipitation curve (toxin-antitoxin) as well as the L_+/Lf ratio vary from one serum to the other. The authors have been able to prepare a fraction which is rich in γ -antitoxin, possesses a L_+/Lf ratio of 4,86, and gives a rounded curve with a very reduced prezone, analogous to the rabbit-pattern curve.

The sera which are rich in β_2 -antitoxins and the fractions enriched in β_2 -antitoxins give the usual horse-pattern curve, and a L_+/Lf ratio of about 0,8.

The place of the mixture giving the initial flocculation is for the γ -antitoxins on the ascending part of the curve, in the antitoxin-excess zone and before the maximum of precipitable nitrogen.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KEKwick (R. A.) et RECORD (B. R.). *Brit. J. exp. Path.*, 1941, **22**, 29. *Chemistry and Industry*, 1941, **60**, 486. — FELL (N.), STERN (K. G.) et COGHIEL (R. D.). *J. Immunol.*, 1940, **39**, 223. — CINADER (B.) et WEITZ (B.). *J. Hyg.*, 1953, **51**, 19.
- [2] VAN DER SCHEER (J.), WYCKOFF (R. W. G.) et CLARKE (F. L.). *J. Immunol.*, 1940, **39**, 65. — PAPPENHEIMER (A. M.), LUNDGREEN (H. P.) et WILLIAMS (J. W.). *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 247. — LUNDGREEN (H. P.), PAPPENHEIMER (A. M.) et WILLIAMS (J. W.). *J. am. chem. Soc.*, 1939, **61**, 533. — DEUTSCH (H. F.) et NICHOL (J. G.). *J. biol. Chem.*, 1948, **176**, 797.
- [3] RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 631.
- [4] PAPPENHEIMER (A. M.) et ROBINSON (E. S.). *J. Immunol.*, 1937, **32**, 291.
- [5] RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E. H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 424.
- [6] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A., Jr). *Bioch. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193. — WILLIAMS (C. A.) et GRABAR (P.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 158, 397 et 404. — RELYVELD (E. H.), GRABAR (P.), RAYNAUD (M.) et WILLIAMS (C. A., Jr). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 688.
- [7] RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E. H.). *Rev. Immunol.* (à paraître).

RECHERCHES SUR *PASTEURELLA SEPTICA*

I. — ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DE SOUCHES ISOLÉES D'ANIMAUX DES ESPÈCES PORCINE ET OVINE

par Roberte et J.-M. GOURDON, M. HENRY et Cl. QUINCHON (*) (**) (avec la collaboration technique de H. MASSIET)

(*Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort*)

La classification de *Pasteurella septica* a subi de profondes modifications :

Autrefois elle reposait sur des bases zoologiques, et la plupart des auteurs étaient d'accord pour affirmer la pluralité des espèces ;

Aujourd'hui elle reconnaît pour critères des caractères culturaux, biochimiques, biologiques (lysotypie) et immunologiques et l'on différencie les espèces *Pasteurella septica* (ou *multocida*) et *Pasteurella hemolytica* avec les types A, B, C, D ou I, II, III, IV selon les auteurs.

Au cours de ces derniers mois, notre attention a été attirée sur la parfaite constance des caractères morphologiques et culturaux des *Pasteurella* isolées des prélèvements ou cadavres de porcs parvenus au laboratoire.

Ces constatations et le fait que nous isolons des *Pasteurella* avec une fréquence relativement grande nous ont conduits à faire une étude systématique des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques des souches provenant de porcins et d'ovins.

Nous avons étudié ainsi 30 souches d'origine porcine et 17 souches d'origine ovine.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 mars 1957.

(**) Nous avons entrepris l'étude bactériologique des souches de *Pasteurella* isolées des prélèvements ou des cadavres de bovins qui parviennent au laboratoire. Nous nous proposons d'en faire connaître les résultats lorsque nous aurons réuni un nombre suffisant de souches.

I. — *Pasteurella d'origine porcine.*

Toutes les souches isolées chez le porc, sauf une, avaient une morphologie très régulière et se présentaient sous la forme de petits bacilles courts, presque cocciformes, à coloration bipolaire. Elles donnaient sur gélose ordinaire des colonies rapidement coalescentes, grasses, translucides et légèrement bleutées. Une seule souche, d'aspect polymorphe, présentait des bacilles de longueur variable et des formes filamenteuses uniformément colorées.

En fait, cette souche appartenait depuis plusieurs années à notre collection où elle était conservée en milieu liquide (bouillon Martin sous huile) et se trouvait auto-agglutinée. Mais nous verrons que, malgré sa morphologie et son état d'équilibre au sein d'une phase liquide, cette souche avait conservé toute sa virulence et ne différait, quant à son pouvoir fermentatif, que par une action retardée sur la glycérine.

Pour chaque souche considérée nous avons étudié cinq caractères culturaux (mobilité, développement en eau de levure, développement sur pomme de terre, caractère fluorescent et muqueux), vingt-neuf caractères biochimiques testés pendant dix jours, la présence d'une hémolysine et le pouvoir pathogène pour le cobaye.

Les *Pasteurella* d'origine porcine présentaient une grande constance de caractères biochimiques et possédaient, par conséquent, un équipement enzymatique identique.

Toutes les souches produisaient rapidement de l'indole. Elles étaient sans action sur le lait tournesolé et la gélatine ; aucune ne se développait en eau de levure et sur pomme de terre.

Toutes attaquaient le glucose, le lévulose, le galactose, le xylose, le saccharose, la mannite, toutes sauf une (n° 22) le mannose, toutes sauf une (n° 18) la sorbite (la souche n° 9 n'attaquait cet alcool qu'après un délai de six jours).

Ces souches étaient sans action sur le lactose, le maltose, l'arabinose, le rhamnose, la glycérine (à l'exception de la souche n° 28 qui faisait fermenter ce glucide après six jours), la dulcite, la dextrine (la souche n° 15 faisant exception au bout de six jours), l'inuline, l'esculine, l'inosite, l'adonite et l'amidon.

Aucune des souches ne possédait d'uréase, aucune ne produisait d'hydrogène sulfuré, aucune n'utilisait le citrate (Simmons) ; elles réduisaient toutes les nitrates en nitrites. Enfin les réactions de Voges-Proskauer et du rouge de méthyle étaient toujours négatives.

Aucune de ces souches n'était hémolytique.

Seize souches, cultivées sur gélose-sérum de cheval et examinées après un séjour de dix-huit heures à l'étuve, ont révélé l'existence d'une fluorescence verte.

Treize souches paraissaient muqueuses.

Nous avons inoculé des *Pasteurella* à des cobayes par voie intraperitoneale, à la dose de 0,25 ml de suspension virulente par animal. Bien que cette voie soit particulièrement sévère, nous avons pu constater des variations de virulence.

Les cobayes morts rapidement présentaient des lésions de septémie hémorragique ; lorsque la survie dépassait quarante-huit heures, les animaux manifestaient une péritonite séro-fibrineuse ; lorsqu'elle dépassait huit jours, la réaction purulente s'étendait à toutes les séreuses.

Nous n'avons pas constaté de relation entre la fluorescence, le caractère muqueux et l'intensité du pouvoir pathogène.

Les souches de *Pasteurella* d'origine porcine conservées en bouillon Martin sous huile gardent, pendant plusieurs mois, leur morphologie et leur virulence.

II. — *Pasteurella* D'ORIGINE OVINE.

Nous avons étudié 17 souches de *Pasteurella* d'origine ovine : 3 d'entre elles avaient la morphologie typique de bacilles très courts à coloration bipolaire ; les autres souches présentaient un polymorphisme plus ou moins accentué ; l'une d'elles renfermait essentiellement des formes filamenteuses.

L'étude des caractères biochimiques a révélé une assez grande disparité des pouvoirs fermentatifs (tableau I).

Nous distinguons d'abord 7 souches qui ne produisaient pas d'indole, attaquaient le maltose et dont certaines, au nombre de 4, attaquaient le lactose après des séjours de quatre, sept et huit jours à l'étuve. Bien que nous n'ayons pu mettre en évidence *in vitro* le pouvoir hémolytique de ces 7 souches, nous pensons qu'il s'agit de *Pasteurella* hémolytiques, telles que les ont décrites Florent et Godbille, car ces souches étaient d'autre part sensibles à l'action de la pénicilline et se trouvaient dénuées de tout pouvoir pathogène pour le cobaye.

Le tableau I montre qu'il existe une grande diversité de pouvoirs fermentatifs au sein des souches d'origine ovine, qu'elles appartiennent ou non à l'espèce *Pasteurella hemolytica*. Une seule souche avait une morphologie et des caractères biochimiques identiques à ceux des *Pasteurella* d'origine porcine, mais elle était sérophile lors de son isolement sur milieux nutritifs et avait exigé l'addition de sérum à ces milieux pendant deux subcultures.

Les caractères communs aux 17 souches de *Pasteurella* d'origine ovine étaient les suivants :

- a) Pas de croissance en eau de levure et sur pomme de terre ;
- b) Fermentation du glucose et du lévulose (la souche n° 4 ayant une action tardive) ;

TABLEAU I. — *Pasteurella d'origine ovine.*

| SOUCHEs | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|--------------------------|---|----|----|----|----|----|---|---|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|
| Morphologie | c | c | P | P | P | P | c | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P |
| Mobilité | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Eau de levure | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pomme de terre | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lait tourneé solé | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Indole | + | + | + | + | 0 | 0 | + | 0 | T2 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + |
| Gélatine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lévulose | + | + | + | T6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Galactose | + | + | T2 | T6 | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | + | + | + | T9 |
| Xylose | + | 0 | + | T5 | + | + | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| Mannose | + | + | + | T5 | 0 | + | + | 0 | + | 0 | 0 | + | + | + | + | + | + |
| Lactose | 0 | 0 | 0 | 0 | T4 | 0 | 0 | 0 | 0 | T7 | T8 | T8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Maltose | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Saccharose | + | T5 | + | T5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T6 | + | + | + |
| Arabinose | 0 | T7 | T8 | T6 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | T7 | 0 | 0 | 0 |
| Rhamnose | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glycérine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | T6 | 0 | 0 | 0 | 0 | T8 | T3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dulcide | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mannite | + | 0 | + | 0 | + | + | + | + | 0 | 0 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + |
| Dextrine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | T2 | 0 | 0 | 0 | U | 0 | 0 |
| Inuline | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Urée | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Voges Proskauer | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| R.M. test | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| H ₂ S | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Esculine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Citrate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nitrates | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Inosite | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | T5 | T8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Adonite | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| Amidon | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | T5 | + | + | 0 | 0 | 0 | + |
| Sorbité | + | 0 | + | 0 | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | + | + | + | T10 | T8 | 0 | 0 |
| Hémolyse | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fluorescence | 0 | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + |
| C. muqueuses | + | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + | 0 | + |
| Pouvoir pathogène cobaye | + | + | + | + | + | 0 | 0 | + | + | - | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + |

Morphologie : c = petit bacille régulier ; P = polymorphisme. *Biochimie* : T6 = fermentation après 6 jours. *Pouvoir pathogène* : + = mort entre 0 et 36 heures ; + = mort entre 36 heures et 4 jours ; ± = mort après 4 jours.

c) Pas de fermentation du rhamnose, de la dulcite, de la dextrine (exception faite de la souche n° 11 qui l'attaquait au bout de deux jours), de l'inuline et de l'esculine ;

d) Absence d'uréase ;

e) Réactions de Voges-Proskauer et du rouge de méthyle négatives ;

f) Non-utilisation du citrate (Simmons) ;

g) Réduction des nitrates en nitrites.

La production d'indole, la fermentation du galactose, du xylose, du mannose, du lactose, du maltose, du saccharose, de l'arabinose, de la glycérine, de la mannite, de l'inosite, de l'adonite, de l'amidon et de la sorbite étaient irrégulières.

Nous n'avons noté chez ces 17 souches aucune relation entre la fluorescence, le caractère muqueux et le pouvoir pathogène.

CONCLUSIONS.

Il ressort de l'étude que nous avons faite, et le tableau I le montre avec netteté, que les souches de *Pasteurella septica* isolées chez les ovins, contrairement à celles isolées chez les porcins, ont des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques très variables.

Sur 29 caractères biochimiques considérés, une souche d'origine ovine possède en moyenne 4,59 caractères variables contre 0,166 pour une souche d'origine porcine.

Il semble donc que l'on rencontre en France, chez le porc, un véritable type biochimique de *Pasteurella* correspondant à un germe dont la morphologie est, elle aussi, absolument univoque.

Son pouvoir pathogène pour le porc est variable :

a) Ou bien on la rencontre à l'état saprophytique dans les voies respiratoires ;

b) Ou bien elle est à l'origine de pleuro-pneumonies importantes, parfois sous la forme primitive, le plus souvent comme germe de sortie d'une virose, associée ou non à *Corynebacterium pyogenes*, à *Pseudomonas aeruginosa*, à un streptocoque pyogène ;

c) Ou bien, mais beaucoup plus rarement, elle est responsable de septicémies hémorragiques.

Actuellement, on considère que le même germe voit sa virulence s'exacerber ou se désintégrer, selon qu'il rencontre des conditions favorables ou défavorables.

Une étude immunologique de ces souches nous permettra de confirmer ou d'infirmer l'unité des souches de *Pasteurella* d'origine porcine qui nous est apparue lors de l'étude des caractères biochimiques.

SUMMARY

STUDIES ON *Pasteurella septica*.I. BACTERIOLOGICAL STUDY OF STRAINS ISOLATED FROM SWINE
AND SHEEP.

Strains of *Pasteurella septica* isolated from swine possess rather stable properties. On the contrary, strains isolated from sheep have many variable morphological, cultural and biological characters.

It seems that, in France, a biochemical type of *Pasteurella* with a corresponding morphology, is found in swine. The pathogenicity of this type is variable.

It seems probable that the virulence of the same germ increases or decreases following favourable or unfavourable conditions.

DÉTERMINATION ÉLECTROMÉTRIQUE DE L'ACTIVITÉ LIPASIQUE DES SOUCHES DE *BRUCELLA*

par J. JANOK, F. NIZNANSKY et V. KREMERY (*)

(*Institut de l'Hygiène du Travail et des Maladies Professionnelles,
Bratislava,
et Institut Scientifique Vétérinaire, Bratislava*)

Au X^e Congrès des Microbiologistes et Epidémiologistes tchécoslovaques tenu à Prague en mai 1956, nous avons présenté une communication sur l'activité des enzymes hydrolytiques des *Brucella* (Niznansky et Kremery [3]) dans laquelle nous avons décrit en détail la méthode de mesure de l'activité lipasique d'après Willstädter et coll. [4]. Le pH du milieu est réglé à des intervalles exactement limités, avec KOH 0,05 N. Le bleu de bromothymol est utilisé comme indicateur. La quantité d'acide butyrique en milligrammes, libéré par la monobutyryne au cours de la décomposition enzymatique pendant cent vingt heures à la température de 37°, donne la mesure de l'activité lipasique des *Brucella*.

Nous avons signalé, dans cette communication, que nous tra-vaillions à la mise au point d'une méthode électrométrique de détermination de l'activité lipasique des bactéries. Dans ce pro-cédé, l'activité lipasique est indiquée par le changement de pH d'un milieu réactif défini ; ce changement est causé par l'acide butyrique libéré par la décomposition de la monobutyryne en vingt-quatre heures à la température de 37° C. Pour exprimer l'activité lipasique, on peut utiliser les mêmes unités que dans la méthode de Willstädter, en calculant le changement de pH d'après la courbe d'évaluation en milligrammes de l'acide buty-rique (fig. 1).

Les résultats de notre étude sont exposés dans le présent travail.

MATÉRIEL EXPÉRIMENTAL.

Appareils et dispositif :

- 1^o Un pH-mètre sur lequel on peut lire 0,5 mV, exactement.
- 2^o Une électrode à la chinchydronne ou en verre, si l'on possède un bon pH-mètre, une au calomel, saturée et submersible.

(*) Manuscrit reçu le 27 mars 1957.

3° De petits vases pour mesurer le pH des volumes réduits.

4° Un thermostat.

Réactifs et solutions employés :

1° La solution tampon de phosphates à pH 7,73. Mélange de 10 ml de KH_2PO_4 M/15, de 90 ml de Na_2HPO_4 M/15, KH_2PO_4 M/15 selon Sörensen et Na_2HPO_4 12 H_2O .

2° Solution de tryptose : on dissout 0,05 g de tryptose-peptone Difco et 0,5 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée.

3° Monobutyryne Kahlbaum.

4° Tween 80.

5° Acide butyrique.

Souches. — Pour l'évaluation électrométrique de l'activité lipa-

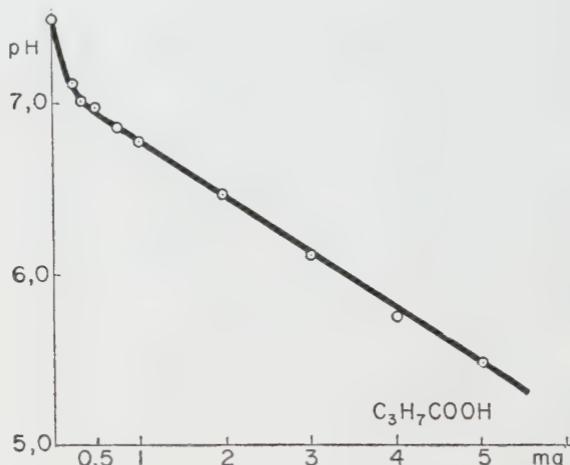


FIG. 1. — Relation du pH et de la quantité de $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}$ dans le mélange : 1,5 ml de solution tampon de phosphate à pH 7,73 ; 2 ml de solution de tryptose et 1,5 ml de solution de $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}$

sique, nous avons employé 12 souches de *Brucella*, chez lesquelles les valeurs de l'activité lipasique étaient relativement stables, qu'elles fussent mesurées par la méthode standard de titrage ou par notre méthode électrométrique, à savoir :

6 souches de *Br. suis* : L-13606, L-14944, Tm-45L-7383, L-5785 ;
 4 souches de *Br. abortus* : L-339, L-16872, B-19, Cadca ;
 1 souche de *Br. melitensis* atypique : Pz-1418 et
 1 souche de *Br. melitensis* : H-20, Foster, Weybridge.

Technique. — A l'aide de l'électrode à la chinchydrone et de l'électrode saturée au calomel, nous avons étudié la relation du

pH du milieu réactif avec la concentration en acide butyrique (fig. 1).

Milieu réactif : 1,5 ml M 7,5 de solution tampon de phosphates à pH 7,73 ; 1,5 ml de solution d'acide butyrique ; 2 ml de solution de tryptose, qui sert à délayer les bactéries.

MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ LIPASIQUE.

Les cultures de *Brucella* ne contenant que des formes S sont récoltées sur gélose inclinée après quarante-huit heures d'étuve ; elles sont mises en suspension dans la solution de tryptose au moyen d'un photomètre (50 p. 100 de passage de la lumière). De cette suspension, nous transférons 3 ml dans un mélange de 9 ml de solution tampon de phosphates M 15 à pH 7,71-7,73 et de 0,5 ml de monobutyryne ou Tween-80 dans un flacon d'Erlenmeyer stérilisé de 50 ml. Après mélange nous déterminons dans une quantité appropriée, environ 3 ml, le pH du mélange réactif (pH 0). L'opération est répétée après quatre heures (pH 4) et puis après vingt-quatre heures (pH 24). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau I.

TABLEAU I

| Souche | Type | pH ₀ | pH ₄ | pH ₂₄ | ΔpH ₂₄ |
|--------------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|
| H - 20/52 | Br. melit. | 7,29 | 7,16 | 7,09 | 0,20 |
| Pz - 1418/55 | " " | 7,33 | 7,25 | 7,16 | 0,17 |
| L - 8194/52 | Br. suis | 7,31 | 7,02 | 6,46 | 0,85 |
| L - 13606/52 | " " | 7,31 | 7,02 | 6,54 | 0,77 |
| L - 14944/52 | " " | 7,31 | 7,01 | 6,66 | 0,65 |
| Tm - 45/56 | " " | 7,31 | 6,92 | 6,60 | 0,71 |
| L - 7383/56 | " " | 7,40 | 7,17 | 6,80 | 0,60 |
| L - 5785/54 | " " | 7,36 | 7,09 | 6,72 | 0,64 |
| L - 339/52 | Br. abortus | 7,31 | 7,10 | 6,92 | 0,39 |
| L - 16872/52 | " " | 7,31 | 7,20 | 7,05 | 0,26 |
| B - 19 | " " | 7,28 | 7,19 | 7,12 | 0,16 |
| Cadca | " " | 7,33 | 7,23 | 7,08 | 0,25 |

DISCUSSION.

La détermination de l'activité lipasique par la méthode de titrage de Willstädter est simple et précise, mais elle demande un temps relativement long. La décomposition des lipides chez les *Brucella* est lente : le changement de couleur de l'indicateur n'apparaît nettement, avec la majorité des souches, qu'après dix-huit à vingt-quatre heures. A cause de cela, la période d'incubation atteint cent vingt heures et alors il se produit une agglutination des brucelles dans le milieu ; certains auteurs prolongent l'incubation jusqu'à huit cents heures (Gorbach, 1955). Ce laps de temps est trop long si l'on a besoin des résultats rapidement, ou s'il ne s'agit pas d'obtenir des valeurs absolues pour une souche, mais seulement des résultats comparatifs permettant de classer les souches d'après leur activité enzymatique.

A cet égard la méthode électrométrique a une plus grande valeur, car elle permet de noter le changement de pH du milieu au bout de quatre heures d'incubation. Après vingt-quatre heures, le changement de pH provoqué par les différents types de *Brucella* est tel que l'on peut, d'après sa valeur, distinguer les souches de *Br. suis* des autres types dont l'activité lipasique est plus faible.

Avec la méthode électrométrique disparaît une source sérieuse d'erreurs : l'estimation subjective du changement de couleur de l'indicateur, surtout si la lecture n'est pas faite du commen-

TABLEAU II

| N° souche | Type | Activité de la lipase | |
|----------------|------------------|---|----------------------------|
| | | par titrage C ₃ H ₇ COOH | électrométr. Δ pH 24 h. |
| I Pz- 1418/55 | Br. melit. atyp. | 5,80 | 0,17 |
| 2 L - 8194/52 | Br. suis | 24,20 | 0,65 |
| 3 L - 5785/54 | " " | 29,0 | 0,85 |
| 4 L - 5785/54 | " " | 19,0 | 0,64 |
| 5 L - 16872/52 | Br. abortus | 9,20 | 0,26 |
| 6 B - 19 | " " | 6,10 | 0,16 |
| 7 Cadca | " " | 8,20 | 0,25 |

cément à la fin par la même personne. De même, dans cette méthode, est écartée toute possibilité d'inhibition de l'indicateur sur le processus enzymatique (Fodor, 1956).

La méthode électrométrique exige plus d'attention et de vigilance pour qu'il ne se produise pas de contamination si l'on a affaire à des microbes pathogènes, mais elle est deux ou trois fois plus précise.

En vue de comparer les deux méthodes, nous donnons, dans le tableau II, les valeurs de l'acide butyrique libéré au cours d'une période de cent vingt heures à la température de 37° C, et par

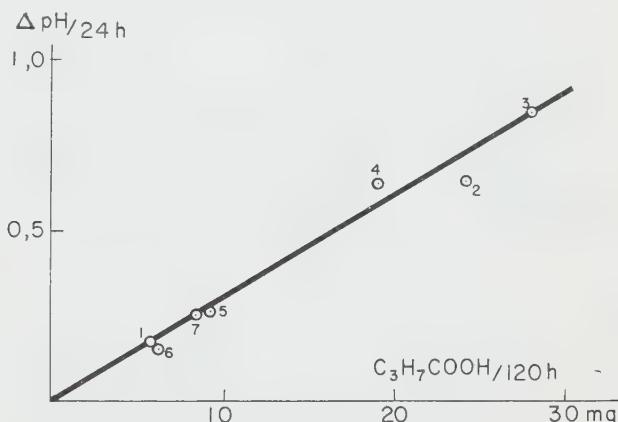


FIG. 2. — Comparaison des valeurs de l'activité lipasique de 7 souches : valeurs obtenues par la méthode de titrage en milligrammes de C_3H_7COOH en cent vingt heures et par la méthode électrométrique : pH vingt-quatre heures. Les valeurs mesurées se trouvent sur le tableau II.

évaluation du changement de pH du milieu au bout de vingt-quatre heures.

La comparaison des résultats est facile sur la figure 2. Les quantités d'acide butyrique libéré en cent vingt heures sont portées en abscisses (résultats de la méthode de titrage) ; en ordonnées sont portés les changements de pH du milieu au bout de vingt-quatre heures (résultats de la méthode électrométrique).

La figure 2 montre que l'évaluation électrométrique reflète bien le cours de la décomposition enzymatique des lipides par les *Brucella*. Il faut, en outre, considérer que, par la méthode électrométrique, on mesure la réaction enzymatique dans les premières vingt-quatre heures, donc dans la phase régulière. On est fondé à se demander si, dans la suite, il ne se produit pas

de changements dans la réaction enzymatique ; en effet, les *Brucella* restent exposées à l'action de l'acide butyrique, et cela peut influencer défavorablement leur vitalité ainsi que leur activité enzymatique.

RÉSUMÉ.

Les auteurs décrivent une méthode électrométrique rapide de détermination de l'activité lipasique chez les diverses variétés de *Brucella*. Ils comparent les résultats obtenus par cette méthode avec les valeurs trouvées par la méthode de Willstädter.

SUMMARY

ELECTROMETRIC DETERMINATION OF *Brucella* LIPASIC ACTIVITY.

The authors describe a rapid electrometric method for determining lipasic activity of different variants of *Brucella*. They compare their results with the figures found by means of Willstädter's method.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FODOR (P. J.). *Nature*, 1946, **158**, 375.
- [2] GORBACH (G.) et coll. *Arch. Mikrobiol.*, 1955, **24**, 237.
- [3] NIZNANSKY (Fr.) et KREMER (Vi). *Vet. casopis*, 1956, n° 6.
- [4] WILLSTADTER (R.) et coll. *Z. Physiol. Chem.*, 1923, **125**, 93.
- [5] JANOK (J.) et LISKA (St). *Bocovnílekárství*, 1955, **7**, 273.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 6 Juin 1957

Présidence de M. PRÉVOT.

COMMUNICATIONS

UNE SOUCHE ATYPIQUE DE *BRUCELLA* ISOLÉE D'UNE CHÈVRE VACCINÉE PAR VACCIN VIVANT

par E. SACQUET et G. RENOUX

(*Institut Pasteur de Tunis,
Centre F. A. O./O. M. S. de la Brucellose*)

Des chèvres d'origine suédoise préalablement vérifiées indemnes de brucellose sont vaccinées le 25 juin 1956 par l'inoculation simultanée de 100 milliards de *Br. abortus* 112 et de 5 ml de culture de *Br. melitensis* 53 H. 38 tuée par le formol [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. Ces animaux sont rigoureusement isolés à la Station expérimentale de Smindja où se poursuit depuis quatre ans une expérimentation sur la brucellose animale dont les résultats nous assurent de la validité de cet isolement [Cf. 16] qui exclut la possibilité d'une infection venant de l'extérieur. Chaque semaine, nous effectuons sur ces chèvres des prélèvements pour examens sérologiques et pour cultures (sang, lait, sécrétions vaginales).

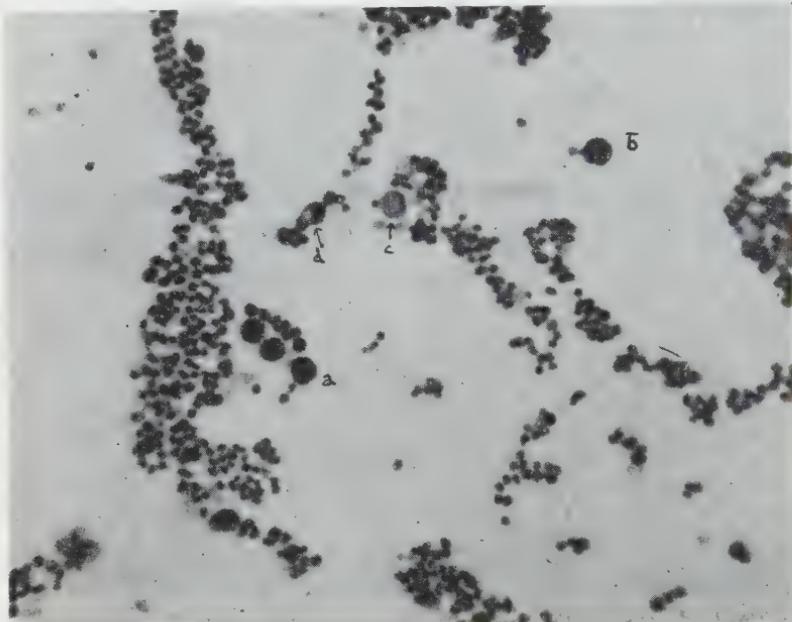
C'est ainsi que d'un échantillon de mucus vaginal de la chèvre n° 219 nous avons isolé le 2 octobre 1956, sur milieu W E [17], une souche de *Brucella* assez peu typique. Culture grêle en petites colonies de 1 à 1,5 mm de diamètre, de couleur jaune ambrée translucide. Au repiquage sur Albimi-Agar, cette culture pousse difficilement, qu'elle soit effectuée ou non en atmosphère contenant 10 p. 100 de gaz carbonique. Sur le même milieu, additionné de 10 p. 100 de sérum de cheval normal, la culture obtenue n'est pas plus abondante, la vitesse de développement reste lente (trois à quatre jours).

Aux épreuves d'identification, cette souche « 219 » se comporte comme *Br. abortus* sur les milieux additionnés de thionine et de fuchsine :

pas de dégagement de SH_2 ; elle est agglutinée au titre final par le sérum monospécifique anti-*abortus*, mais est agglutinée à 1:40 par le sérum monospécifique anti-*melitensis*. La souche *Br. abortus* 112 d'origine n'est pas agglutinée par le sérum anti-*melitensis*.

Cinq milliards de bâcilles vivants de la souche « 219 » inoculés au cobaye ne créent pas de lésions macroscopiques, ne font pas apparaître d'agglutinines spécifiques; les cultures de sang, de foie et de rate sont négatives.

A l'examen au microscope, après coloration par la méthode de Gram-Nicolle, on constate, comme le montre le cliché ci-joint (cliché Dr Huet),



un pléomorphisme assez remarquable : petits éléments coccoïdes, formes bacillaires, formes en massues et surtout de très grosses boules ou sphères, de 4 à 6 μ de diamètre. Ces grosses formations se présentent sous des aspects divers :

- a) Apparence homogène se colorant intensément ;
- b) Le même corps homogène émet un prolongement plus clair qui donnera une forme bactérienne ;
- c) Corps homogène de coloration plus claire, émettant lui aussi un prolongement ;
- d) Un corps intensément coloré prenant une forme que l'on oserait appeler « haltéroïde » et présentant une vacuole claire.

Nous n'avons pas connaissance d'une publication qui fasse état de modifications morphologiques aussi importantes d'une souche de *Bru-*

cella. On a cependant décrit des modifications filamenteuses de cette espèce bactérienne [48].

Les modifications des caractères d'identification sont déjà connues par quelques exemples [Cf. 19] ; aucune jusqu'ici ne portait aussi sur les caractères sérologiques.

Ainsi, nous avons isolé, des sécrétions vaginales d'une chèvre en cours d'immunisation par vaccin vivant (souche *Br. abortus* 112 typique), une souche de *Brucella* atypique par ses caractères culturaux, morphologiques et sérologiques. Les conditions strictes de l'expérimentation excluent l'explication par infection exogène, qui est la première qui vient à l'esprit. On est quasi obligé de conclure qu'il s'agit là d'une modification *in vivo* de la souche vaccinale.

Une souche ayant les caractères de cette souche « 219 », si elle était rencontrée dans la nature, serait vraisemblablement classée comme étant une espèce nouvelle de *Brucella*.

SUMMARY

ISOLATION OF AN ATYPICAL STRAIN OF *Brucella* FROM A GOAT IMMUNIZED WITH A LIVING VACCINE.

In the course of immunization of a goat with a living vaccine (typical *Br. abortus*, 112 strain) it has been possible to isolate from the vaginal secretions of the animal an atypical *Brucella* strain (cultural, morphological and serological properties). The experimental conditions were strict and an exogenous infection was not possible. It seems therefore that an *in vivo* modification of the immunizing strain has taken place.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MORALES OTERO (P.). *Porto Rico J. publ. Hlth.*, 1929, **5**, 144.
- [2] MORALES OTERO (P.). *J. inf. Dis.*, 1933, **52**, 54.
- [3] LISBONNE (M.), ROMAN (G.) et RENOUX (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1938, **206**, 954.
- [4] LISBONNE (M.), ROMAN (G.) et RENOUX (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **61**, 823.
- [5] LISBONNE (M.), ROMAN (G.) et RENOUX (G.). *Arch. Soc. Sci. méd. biol. Montpellier*, 1938-1939, 470.
- [6] RENOUX (G.). *Thèse médecine*, Montpellier, 1939.
- [7] LISBONNE (M.), ROMAN (G.) et RENOUX (G.). *Bull. Acad. Vét. France*, 1939, **12**, n° 7.
- [8] LISBONNE (M.), ROMAN (G.) et RENOUX (G.). *Third intern. Congr. Microb., New York, Rep. of Proceed.*, 1939, p. 606.
- [9] LISBONNE (M.), ROMAN (G.) et QUATREFAGE (H.). *Bull. Acad. Vét. France*, 1947, **20**, n° 4.
- [10] RENOUX (G.). *Rev. Immunol.*, 1950, **14**, 279.
- [11] CARRÈRE (L.) et QUATREFAGE (H.). *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **143**, 365.
- [12] CARRÈRE (L.) et QUATREFAGE (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 274.
- [13] CARRÈRE (L.) et QUATREFAGE (H.). *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 196.
- [14] RENOUX (G.), AMARASINGHE (A.) et ALTON (G.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1955, **32**, 249.

[15] RENOUX (G.), ALTON (G.) et AMRASINGHE (A.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1957, **34**, 3.

[16] RENOUX (G.), ALTON (G.) et MAHAFFEY (L. W.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1955, **32**, 65.

[17] RENOUX (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 325.

[18] NELSON (E. L.) et PICKETT (M. J.). *J. inf. Dis.*, 1951, **89**, 226.

[19] RENOUX (G.), AMARASINGHE (A.) et SACQUET (E.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1955, **32**, 375.

ÉTUDE DES SOUCHES DE *BRUCELLA* ISOLÉES EN POLOGNE

par A. CHODKOWSKI et J. PARNAS

(*Institut des Maladies professionnelles et de l'Hygiène rurale, Lublin*
[Directeur : professeur J. PARNAS])

On a déjà procédé à l'analyse microbiologique de la première collection des souches de *Brucella* isolées en Pologne. Le but du présent article est le typage des souches de *Brucella* isolées en Pologne. Cette étude est nécessaire, car nous importons des ovins de différents pays dans lesquels la brucellose n'est pas rare.

Les résultats des recherches de Chodkowski et Parnas [1955] (1) ont montré que l'on a isolé en Pologne des souches de *Brucella* des variétés *abortus bovis* typiques et atypiques (dont quelques-unes représentent des variétés intermédiaires), ainsi que des souches de *Br. suis* et *Br. melitensis*. Les souches de *Br. suis* isolées en Pologne se comportent comme les variétés danoises de *Br. suis*.

Nous décrirons ici les résultats du typage de 39 souches récemment isolées qui nous ont été envoyées de différentes régions de Pologne, en particulier de l'Institut Vétérinaire de Pulawy et du Service d'Epidémiologie de l'Institut d'Hygiène d'Etat de Varsovie.

TECHNIQUE. — La technique employée a été décrite par Chodkowski et Parnas [1955] (1). Nous décrirons ici seulement quelques modifications que nous avons apportées à la méthode de typage par l'emploi d'un milieu bactériostatique constitué par des bandes de papier imprégnées de thionine (1/800) et de fuchsine basique (1/300). A la surface du milieu, verticalement par rapport aux bandes de papier, on étale une anse de souches standards de *Br. melitensis*, *Br. suis* et *Br. abortus*, en suspension dans une solution physiologique, à raison de 100 millions par millilitre ; cet étalement est répété quatre fois. Puis la souche type de forme smooth, cultivée quarante-huit heures, en suspension en eau physiologique (1 milliard/ml) est étalée à la surface du milieu ; la

(1) A. Chodkowski et J. Parnas, *Annales Universitatis Mariae-Curie Skłodowska*, 1955, **10**, 1.

même souche est alors mise en suspension en eau physiologique à raison de 100 millions de germes par millilitre, puis étalée quatre fois avec une anse ; avec la même anse, on fait ensuite deux nouveaux étalements à l'extrême libre du milieu. La culture est incubée à 37°, avec 10 p. 100 de CO₂, pendant quatre à cinq jours, et on lit le résultat.

L'amélioration que nous avons apportée à la méthode consistait à étendre à la surface du milieu bactériostatique trois souches témoins ((*Br. bovis*, *Br. suis* et *Br. melitensis*), puis la souche à examiner. Les résultats ainsi obtenus ont été bien meilleurs que précédemment. Les autres réactions (besoins en CO₂, production d'H₂S, activité catalasique et uréasique, emploi des sérum monospécifiques) ont été faites suivant les méthodes usuelles.

Les résultats que nous avons obtenus ont été les suivants.

Sur 39 souches examinées, nous en avons classé 18 comme des variétés *bovis* typiques, 6 comme des variétés *bovis* atypiques, 10 comme des variétés *suis* typiques, 4 comme des variétés *suis* atypiques et 1 comme variété *melitensis* atypique. Cette dernière, provenant de l'Institut de Microbiologie de l'Académie des Sciences de Sofia (Angeloff), avait été classée à Sofia comme une variété *melitensis* typique.

On sait qu'une épreuve unique dans le typage des souches de *Brucella* peut donner des résultats divers ; c'est pourquoi nous avons employé plusieurs épreuves, en tenant toujours compte de l'animal qui avait fourni la souche.

Les souches n°s 203, 204, 206 et 213, envoyées par le Service d'Epidémiologie de l'Institut d'Hygiène de Varsovie, isolées de bovins et d'un lièvre, ont présenté des caractères particuliers ; aussi les avons-nous étudiées avec un soin spécial. Du point de vue morphologique et cultural, elles se comportent comme des souches de *Brucella* normales. Elles présentaient les propriétés biochimiques suivantes : croissance sur milieux dépourvus de CO₂, production d'H₂S pendant huit jours ; l'activité uréasique de la souche n° 203 était sept minutes, celle de la souche n° 204, huit minutes, celle de la souche n° 206, sept minutes, celle de la souche n° 213, sept minutes.

Epreuve des glucides.

| NUMÉRO DE LA SOUCHE | LACTOSE | GLUCOSE | MALTOSE | SACCHAROSE | MANNITOL |
|------------------------|---------|---------|---------|------------|----------|
| — | — | — | — | — | — |
| 203 | — | — | — | — | — |
| 204 | — | — | — | — | — |
| 206 | — | — | — | — | — |
| 213 | — | — | — | — | — |

Action des colorants bactériostatiques.

| NUMÉRO DE LA SOUCHE | FUCHSINE BASIQUE | THIONINE |
|---------------------|------------------|----------|
| — | — | — |
| 203 | — | + |
| 204 | — | + |
| 206 | — | + |
| 213 | — | + |

Epreuve sérologique avec l'immunsérum monospécifique anti-bovis suis (titre 1/1 600) et monospécifique anti-melitensis (titre 1/400).

| NUMÉRO DE LA SOUCHE | SÉRUM MONOSPÉCIFIQUE ANTI-bovis suis | SÉRUM MONOSPÉCIFIQUE ANTI-melitensis |
|------------------------|---|---|
| — | — | — |
| 203 | 1/50 | — |
| 204 | 1/50 | — |
| 206 | 1/50 | — |
| 213 | 1/50 | — |

Epreuve avec l'anti-sérum de lapin (titre 1/400).

| NUMÉRO DE LA SOUCHE | TITRE DU SÉRUM ANTI-bovis suis | TITRE DU SÉRUM ANTI-melitensis |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| — | — | — |
| 203 | 1/25 | — |
| 204 | 1/25 | — |
| 206 | 1/25 | — |
| 213 | 1/25 | — |

Les réactions ont été pratiquées plusieurs fois avec les mêmes résultats.

Réactions sérologiques avec l'immunsérum monospécifique anti-bovis suis (1/1 600) et anti-melitensis (1/200).

| NUMÉRO DE LA SOUCHE | TITRE DU SÉRUM ANTI-bovis suis | TITRE DU SÉRUM ANTI-melitensis |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| — | — | — |
| 203 | 1/25 | — |
| 204 | 1/25 | — |
| 206 | 1/25 | — |
| 213 | 1/25 | — |

Les réactions d'agglutination ont été faites avec les sérums suivants :

| NUMÉRO DE LA SOUCHE | Salmonella typhi | Salmonella PARA A | Salmonella PARA B | ANTI-Shigella POLYVALENT |
|------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| — | — | — | — | — |
| 203 | — | — | — | — |
| 204 | — | — | — | — |
| 206 | — | — | — | — |
| 213 | — | — | — | — |

CONCLUSIONS. — L'analyse microbiologique des souches de *Brucella* n°s 203, 204, 206 et 213 a montré qu'elles représentaient des variétés très particulières de type intermédiaire, avec faible agglutinabilité et faible pouvoir antigénique. Nous avons entrepris l'étude de ces caractères particuliers.

Sur 39 souches de *Brucella* examinées, nous avons trouvé :

| | SOUCHE |
|---|--------|
| <i>Brucella bovis</i> , variétés typiques | 18 |
| <i>Brucella bovis</i> , variétés atypiques | 6 |
| <i>Brucella suis</i> , variétés typiques | 10 |
| <i>Brucella suis</i> , variétés atypiques | 4 |
| <i>Brucella melitensis</i> , variétés atypiques | 1 |

Sur 164 souches de *Brucella* isolées en Pologne de 1952 à 1956, nous avons trouvé :

| | SOUCHES |
|---|---------|
| <i>Brucella bovis</i> , variétés typiques | 127 |
| <i>Brucella bovis</i> , variétés atypiques | 11 |
| <i>Brucella suis</i> , variétés typiques | 14 |
| <i>Brucella suis</i> , variétés atypiques | 9 |
| <i>Brucella melitensis</i> , variétés typiques | 1 |
| <i>Brucella melitensis</i> , variétés atypiques | 2 |

TABLEAU. — Types des souches de *Brucella* provenant de Pologne et de l'étranger.

| Origine des souches | Br. bovis | | | Br. suis | | | Br. melitensis | | | Total | | |
|---------------------|-----------|-------|-------|----------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Typ. | Atyp. | Total | Typ. | Atyp. | Total | Typ. | Atyp. | Total | Typ. | Atyp. | Total |
| Pologne | 127 | 11 | 138 | 14 | 9 | 23 | 1 | 2 | 3 | 144 | 22 | 164 |
| Etranger | 8 | 1 | 9 | 7 | 1 | 8 | 3 | - | 3 | 18 | 2 | 20 |
| Total | 135 | 12 | 147 | 21 | 10 | 31 | 4 | 2 | 6 | 160 | 24 | 184 |

SUMMARY

STUDIES ON STRAINS OF *Brucella* ISOLATED IN POLAND.

Microbiological analysis of strains n° 203, 204, 206 and 213 has shown that they are very peculiar varieties of intermediate types, with low agglutinability and weak antigenic properties.

ÉTUDE DU SÉRUM D'UN SUJET ATTEINT D'HYPERLIPÉMIE ESSENTIELLE

par G. NORA, M. M. LÉVY et G. SANDOR

(Institut Pasteur et Hôpital Rothschild)

L'hyperlipémie essentielle, maladie familiale, est une affection relativement rare. Dans une revue récente, Hollister et Kanters [1] n'ont pu recueillir que 48 cas décrits. Celui que nous rapportons est intéressant en raison du taux excessif des lipides dépassant, nous semble-t-il, tous ceux mentionnés dans la littérature. Mais, en dehors de ce problème de pathologie, le fractionnement de ce sérum suivi d'études

immunochimiques nous a permis de répondre à certains problèmes concernant les lipoprotéides sériques.

Depuis un an environ le sérum de notre malade a été étudié à plusieurs reprises. Habituellement il est lactescent et contient un taux de lipides oscillant autour de 15 p. 100. Mais à une occasion, sans raison apparente, le sérum est clair et le taux des lipides n'est que faiblement augmenté. Le diabète et la néphrose lipoidique sont éliminés et, en raison du caractère laiteux du sérum et de la proportion très élevée de graisses neutres, on pose le diagnostic d'hyperlipémie essentielle.

Nos études portent, plus particulièrement, sur la dernière prise de sang ayant fourni un sérum contenant 18 p. 100 de lipides. Un taux aussi élevé n'a pas été relevé par Hollister et Kanters [1]. Précisons, cependant, que nous utilisons la méthode classique de Kumagawa, alors que, le plus souvent, on met en œuvre des techniques d'extraction rapide pouvant être insuffisantes. La composition des lipides totaux s'établit comme suit :

| CHOLESTÉROL | PHOSPHATIDES P. 100 DE LIPIDES | GLYCÉRIDES |
|-------------|-----------------------------------|------------|
| — 9,3 | — 9,8 | — 76,3 |

Le sérum s'éclaircit lorsqu'on utilise, selon Burstein [2], l'héparine en présence de calcium sans dialyse préalable. Rappelons qu'il en est ainsi aussi pour les chylomicrons des sérum post-prandiaux [3]. Par contre, les lipoprotéides de densité faible ayant des constantes de flottation relativement réduites ne précipitent par l'héparine qu'à partir du sérum dialysé [2]. Les lipoprotéides présents qui floquent sous l'effet de l'héparine ont la composition suivante :

| LIPIDES PROTÉIDES + LIPIDES | CHOLESTÉROL | PHOSPHATIDES P. 100 DE LIPIDES | GLYCÉRIDES |
|--------------------------------|-------------|-----------------------------------|------------|
| — 95,4 p. 100 | — 9,4 | — 10,8 | — 75,1 |

Le sérum est fractionné, en outre, après dialyse, isoélectriquement selon Sandor et Ceddaha [4]. Les résultats obtenus sont consignés ci-après dans un tableau. La précipitation isoélectrique fractionnée éclaircit le sérum comme l'héparine et il ne reste plus dans les eaux mères que 4 p. 100 des lipides totaux. Les compositions sont intéressantes à examiner. La première fraction, qui précipite au-dessus de pH 6,57, entraîne les mêmes lipides que les chylomicrons. En effet, les deux analyses les plus détaillées, relevées à ce sujet dans la littérature scientifique, donnent les résultats suivants :

| INDICATION BIBLIOGRAPHIQUE | CHOLESTÉROL | PHOSPHATIDES P. 100 DE LIPIDES | GLYCÉRIDES |
|-------------------------------|-------------|-----------------------------------|------------|
| — [5] | — 7 | — 7,2 | — 83 |
| — [6] | — 5,4 | — 7,4 | — 86 |

La correspondance est excellente. Puis, les phosphatides augmentent progressivement et les glycérides diminuent, les premiers passant par un maximum net et les seconds par un minimum pour la fraction qui se sépare à pH 5,89. Les compositions changent à nouveau pour les précipités qui se séparent à des pH encore plus acides. On a ainsi l'impression que trois sortes au moins de lipoprotéides distincts existent dans ce sérum hyperlipémique.

| Fractionnement isoélectrique et composition des fractions obtenues. | | | |
|---|---------------------------|--|------|
| pH de la précipitation: | Lipides protéides+lipides | cholestérol phosphatides glycérides p.100 de lipides | |
| 6,96 à 6,57 | ----- | 8,4 | 6,2 |
| 6,57 à 6,25 | 92 p.100 | 8,4 | 10,6 |
| 6,25 à 5,89 | 95,5 " | 8,9 | 17,3 |
| 5,89 à 5,30 | 86,6 " | 11 | 12,6 |
| 5,30 à 5 | 92,9 " | 8,7 | 12,3 |
| Eaux mères | 19,4 " | 7,6 | 13,6 |
| | | | 75 |

Les lipoeuglobulines sont solubles dans l'eau salée et les solutions laiteuses sont stables. Celles qui précipitent entre pH 5,3 et 5 sont soumises à l'analyse immunochimique. Le sérum de lapin anti-sérum humain donne, selon Ouchterlony, au moins, trois traits de précipitation, dont deux dus, certainement, à des impuretés holoprotéïdiques. Le sérum de lapin anti-lipoprotéide de densité faible humain pur, que nous avons à notre disposition, donne le trait de précipitation unique qui était à prévoir. Il est intéressant de remarquer que ce trait se développe très tardivement et presque au niveau du godet même de l'antigène. L'anticorps devait donc aller chercher quasi sur place un antigène très peu diffusible. Le lipoprotéide présent diffère donc des chylomicrons qui, selon Middleton [7], ne réagiraient avec les anti-lipoprotéides qu'après digestion stéapsique. Pourtant, les taux lipoïdiques ne s'écartent pas de beaucoup. Les chylomicrons contiennent environ 98 p. 100 de lipides [5, 6], alors que nous pouvons estimer qu'à l'état pur notre lipoprotéide en contient au moins 96 p. 100. En effet, le taux lipoïdique atteint 95,5 p. 100 pour certaines de nos fractions, pourtant brutes.

SUMMARY

STUDY OF THE SERUM OF A PATIENT SUFFERING OF ESSENTIAL HYPERLIPIDEMIA.

Report of a case of essential hyperlipidemia, with a level of serum lipids of 18 %. Lipoprotein are almost totally precipitated by heparin in the presence of Ca++ following Burstein's method, or by isoelectric fractionation following Sandor and Ceddaha's technique. The composition of most of the lipoidic fractions is different from the composition of chylomicrons. By diffusion in agar-gel, the lipoproteins give a line of precipitation with an anti-lipoprotein serum of low density.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HOLLISTER (L. E.) et KANTERS (S. L.). *Gastro-Enterology*, 1955, **29**, 1069.
- [2] BURSTEIN (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **243**, 527.
- [3] BURSTEIN (M.) et SAMAILLE (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **241**, 664.
- [4] SANDOR (G.) et CEDDAHA (L.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 1525.
- [5] BRAGDON (J. H.), HAVEL (R. J.) et BOYLE (E.). *J. Lab. clin. Med.*, 1956, **48**, 36.
- [6] LAURELL (C. B.). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1954, **6**, 22.
- [7] MIDDLETON (E. Jr.). *Am. J. Physiol.*, 1956, **175**, 309.

**ÉTUDE DU POUVOIR MICROBICIDE
DE LA GELÉE ROYALE SUR LE BACILLE DE KOCH
ESSAI DE FRACTIONNEMENT DU PRINCIPE ACTIF**

par H. LANGLADE, H. HINGLAIS et M. HINGLAIS (*)

Dans un travail précédent, nous avons montré que l'action bactéricide de la gelée royale [1] s'exerce avec la même netteté sur le bacille de Koch [2].

Il était intéressant de rechercher dans quelle fraction de la gelée royale se trouvait le principe actif. Nous avons fait porter ces premiers essais sur deux fractions : fraction aqueuse, fraction alcooloo-soluble.

PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX. — I. *Origine de la gelée royale.* — Les expériences ci-dessus relatées ont été faites avec un échantillon de gelée royale qui nous a été remis par M. Chauvin (Laboratoire d'Apicologie du Ministère de l'Agriculture) ; récoltée en juillet 1955, remise par M. Chauvin en avril 1956.

Elles ont été corroborées avec deux autres échantillons d'une origine différente (échantillons Gautherie récoltés dans un centre apicole de Corrèze sous le contrôle personnel de M. Gautherie, pharmacien à Egleton, Corrèze). Mélanges datant d'au moins huit jours et au plus trois mois après leur remise au laboratoire.

Un de ces deux derniers échantillons a fait l'objet, en outre, d'un essai complémentaire après huit mois de conservation en glacière à +4° pour étude de l'influence éventuelle du vieillissement.

Résultats identiques dans tous les cas.

II. *Origine des souches de Mycobacterium tuberculosis.* — L'échantillon Chauvin a été essayé contre une souche de B. K. de type humain virulente pour le cobaye, isolée dans notre laboratoire à partir d'une urine humaine et identifiée par nous.

(*) Note présentée à la Société Française de Microbiologie du 18 octobre 1956.

Les échantillons Gautherie ont été essayés :

L'un : a) sur la même souche de type humain, b) sur une souche de type bovin de virulence atténuée pour le cobaye (souche Pasteur-Vallée) ;

L'autre, sur deux autres souches type humain différentes de la précédente et toutes deux virulentes pour le cobaye et identifiées par nous.

Résultats identiques dans tous les cas.

III. *Conditions de conservation des souches.* — Les germes proviennent de cultures en milieu de Dubos et sur Löwenstein-Jensen, âgées de 14 jours. Un essai spécial a été fait sur le bacille humain isolé des urines, conservé trois mois sur Löwenstein-Jensen à +18° pour étudier l'influence du vieillissement du germe sur sa résistance à l'action antiseptique.

Résultats identiques dans tous les cas.

IV. *Influence de la concentration des germes.* — La concentration indiquée dans la note que nous présentons, ramenée au poids de gelée royale totale, était, pour la première expérience :

0,15 mg de germes par 100 mg de gelée royale totale ;

0,20 mg de germes par 100 mg de gelée royale totale, pour la seconde expérience (fraction alcoolique).

Nous avons renouvelé l'essai, toutes choses égales par ailleurs, aux concentrations suivantes :

0,04 mg de germes par 100 mg de gelée royale ;

0,05 mg de germes par 100 mg de gelée royale ;

0,08 mg de germes par 100 mg de gelée royale ;

0,30 mg de germes par 100 mg de gelée royale ;

0,40 mg de germes par 100 mg de gelée royale ;

4 mg de germes par 100 mg de gelée royale.

Les résultats sont demeurés identiques à tous ces degrés de concentration microbienne.

V. *Essai du miel.* — Des essais ont été faits ou sont en cours avec :

1^o Le miel ;

2^o La propolis ;

3^o La cire ;

4^o La bouillie gastrique ;

5^o Les pollens de fleurs le plus couramment butinées par les abeilles ;

6^o Le venin d'abeille.

Ces expériences feront l'objet d'une publication spéciale. Nous préciserons seulement ici que nos premiers essais sur le miel (origine corrézienne précitée) n'ont pas permis d'y retrouver le puissant germicide actif sur le B. K. existant dans la gelée royale.

RÉSULTATS. — 1^o FRACTION AQUEUSE. — 1 g de gelée royale est traité en trois épuisements à la température ordinaire (+18°) par 10 cm³ d'eau distillée au total. On obtient ainsi :

a) 10 cm³ de solution aqueuse opalescente de pH 5 ;

b) Un résidu insoluble de consistance gélatineuse qu'on met en suspension dans 10 cm³ d'eau distillée (pH 5).

Principe de l'expérience. — Pouvoir bactéricide. — Trois prises d'essai de $0,15 \text{ cm}^3$ d'une culture de B. K. en milieu de Dubos âgée de 20 jours et contenant chacune environ 0,3 mg de germes sont respectivement mises en contact pendant vingt-quatre heures avec :

2 cm^3 de solution aqueuse (a) ci-dessus ;

2 cm^3 de suspension aqueuse de résidu insoluble (b) ci-dessus ;

2 cm^3 d'eau distillée (témoin).

Après ce contact de vingt-quatre heures, trois prises d'essai de $0,25 \text{ cm}^3$ de ces trois mélanges contenant chacune environ 0,035 mg de germes sont ensemencées sur Löwenstein-Jensen.

On obtient les résultats résumés au tableau I.

TABLEAU I.

| Durée de culture | Extrait aqueux | Suspension de culot | Témoin sans Gelée R. |
|------------------|----------------|---------------------|----------------------|
| 8 jours | - | - | ± |
| 12 jours | - | + | +++ |
| 25 jours | - | ++ | |
| 60 jours | - | ++ | |
| 180 jours | - | ++ | |

+++ colonies confluentes ; ++ colonies très nombreuses confluentes ; + nombreuses colonies isolées ; ± microcolonies ; — culture négative.

Ce premier essai démontre que le principe germicide de la gelée royale passe intégralement dans la fraction soluble dans l'eau et n'existe plus dans le faible résidu insoluble.

2^o FRACTION ALCOOLIQUE. — *Préparation de l'extrait.* — 200 mg de gelée royale sont soigneusement triturés dans 2 cm^3 d'alcool à 95° à la température ordinaire (+18°), puis laissés en contact quinze minutes et centrifugés. Le culot obtenu est repris de la même façon par 1 cm^3 d'alcool à 95°. Ce traitement est répété deux fois. Les liqueurs alcooliques (5 cm^3) sont réunies, évaporées à sec à +37° pendant vingt-quatre heures.

On obtient un résidu brut aromatique, jaune pâle, pesant 49,8 mg, représentant 25 p. 100 en poids de la gelée royale fraîche. Cet extrait brut est purifié de nouveau au moyen de deux extractions par 1 cm^3 d'alcool à 95°. Les liqueurs alcooliques réunies et évaporées à +37° laissent un résidu jaune pâle pesant 31,2 mg et représentant 15,6 p. 100 du poids de gelée royale fraîche initiale. Les résidus insolubles dans l'alcool sont conservés pour être essayés de la même manière que l'extrait alcoolique soluble.

Chacune des deux fractions (alcoolo-soluble et alcoolo-insoluble) est additionnée de 0,4 cm^3 de culture de B. K. en milieu de Dubos âgée de 15 jours (soit environ 0,8 mg de germes) et d'eau distillée pour amener le volume à 0,8 cm^3 . On laisse en contact pendant une durée de trente minutes, durée largement suffisante pour tuer le B. K. avec la gelée royale totale.

Après ce contact, on ensemence sur Dubos et sur Löwenstein-Jensen

0,05 cm³ de chaque mélange ci-dessus, représentant 0,025 cm³ de culture pure de B. K. initiale et environ 0,05 mg de germes.

Le tableau II résume les résultats.

TABLEAU II.

| Durée de contact | Durée des cultures | Extrait alcoolique soluble | Résidu alcoololo-insoluble | Témoin sans G.R. |
|------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|
| 30 minutes | 6 jours | - | - | - |
| | 12 jours | - | +++ | +++ |
| | 30 jours | - | | |
| | 60 jours | - | | |
| | 90 jours | - | | |
| | 120 jours | - | | |
| 24 heures | 6 jours | | - | - |
| | 12 jours | | ++ | +++ |

On voit que le principe actif est passé tout entier dans la fraction soluble dans l'alcool. Le résidu insoluble est absolument inactif sur le bacille de Koch, même après un contact prolongé pendant vingt-quatre heures.

CONCLUSIONS. — Ces deux groupes d'expériences démontrent que le principe bactéricide est :

- 1^o Entièrement soluble dans l'eau ;
- 2^o Entièrement soluble dans l'alcool à 95°.

La fraction alcoololo-soluble totale de la gelée royale représente dans nos essais environ 15 p. 100 du poids correspondant de gelée fraîche totale (1).

Nous poursuivons donc actuellement les essais de fractionnement à partir de ce concentré alcoololo-soluble actif.

SUMMARY

STUDIES ON THE BACTERICIDAL ACTIVITY OF THE ROYAL JELLY
ON TUBERCLE BACILLI.

ATTEMPTS TO FRACTIONATE THE ACTIVE SUBSTANCE.

The royal jelly contains a substance which possesses a bactericidal activity on the tubercle bacillus. The bactericidal substance is entirely soluble in water and in 95° alcohol. The alcoololo-soluble fraction of the royal jelly constitutes about 15 % in weight of the total fresh jelly.

(1) Il est évident qu'aux doses mises en œuvre dans ces premiers essais, aucun rapprochement n'est valable du point de vue quantitatif avec la puissance d'action des dérivés classiques du type isoniazide par exemple. Mais il s'agit ici de premiers stades de purification qui ne laissent rien présumer de la concentration réelle du principe actif pur dans l'extrait brut en expérience. Tout calcul comparatif de concentration efficace avec les médicaments purs connus serait donc jusqu'ici dénué de signification.

BIBLIOGRAPHIE

[1] HINGLAIS (H. et M.) et GAUTHERIE (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 127.
 [2] HINGLAIS (H. et M.), GAUTHERIE (J.) et LANGLADE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 684.

**DÉMONSTRATION DIRECTE DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ
DES SOUCHES DE BACILLES TUBERCULEUX
VIS-A-VIS DES ISONIAZIDES**

par Paul HAUDUROY et Claude WACHSMUTH

(Institut d'Hygiène de Lausanne)

La démonstration est à peu près certainement faite, à l'heure actuelle, que les bacilles tuberculeux, ayant une « certaine » résistance aux isoniazides, ne possèdent plus un pouvoir pathogène normal lorsqu'on les inocule au cobaye, ce pouvoir ayant plus ou moins diminué.

Cette démonstration n'est cependant pas absolue, des résultats contradictoires ayant été observés. Nombre d'auteurs ont alors soupçonné la présence, dans certaines souches utilisées, d'éléments bactériens dont les sensibilités à l'INH ne seraient pas les mêmes, les uns étant nettement résistant (donc en principe peu pathogènes), les autres étant infinitiment sensibles (donc normaux). Il y aurait hétérogénéité.

Différentes techniques ont été employées pour le prouver. Mais, il s'est toujours agi de techniques *indirectes*.

Nous croyons pouvoir apporter maintenant une démonstration *directe* de l'existence de cette hétérogénéité.

Nous avons ensemencé à partir d'une souche originelle (que nous appelons « souche globale ») des *cellules bactériennes isolées*. Celles-ci donnent naissance à des colonies méritant véritablement le nom de clones.

Pour ce faire, nous utilisons le « séparateur de germes » [1] mis au point par l'un de nous (1), appareil nous ayant déjà permis de montrer pour la première fois la coexistence dans une même souche d'éléments pathogènes et non pathogènes [2].

(*) Note présentée à la séance de la Société Française de Microbiologie du 10 janvier 1957.

(1) J'avais signalé, lors de la première description de cet appareil, qu'il ne permettait pas l'isolement de cellules isolées de Mycobactéries. En réalité, cet isolement est possible. Mais les « séparateurs de germes » fabriqués à la main ne sont pas tous identiques entre eux. Il en résulte que certains appareils seulement laissent « passer » les Mycobactéries. Tout appareil nouvellement acheté est essayé au laboratoire dès son arrivée et est marqué d'une façon particulière si les essais avec les Mycobactéries sont favorables.

Nous avons pris 7 « souches globales » dont les résistances à l'INH sont différentes, les titrages étant faits en milieu de Dubos avec des doses d'antibiotiques allant de $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ à $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Voici la liste de ces souches avec leurs sensibilités et leurs résistances respectives :

N° 628 résiste à $20 \mu\text{g}$, sensible à $30 \mu\text{g}$; n° 441 résiste à $20 \mu\text{g}$, sensible à $30 \mu\text{g}$; n° 590 résiste à $10 \mu\text{g}$, sensible à $20 \mu\text{g}$; n° 887 résiste à $10 \mu\text{g}$, sensible à $20 \mu\text{g}$; n° 570 résiste à $20 \mu\text{g}$, sensible à $30 \mu\text{g}$; n° 319 résiste à $50 \mu\text{g}$, sensible à $60 \mu\text{g}$; n° 576 résiste à $50 \mu\text{g}$, sensible à $60 \mu\text{g}$.

Chacune de ces souches est passée à travers le séparateur de germes, les ensemencements faits sur milieu de Löwenstein-Jensen coulé en boîte de Petri. Chaque boîte est scellée pour éviter la dessiccation. Après un temps convenable de séjour à 37° , des colonies isolées apparaissent. Nous titrons alors la sensibilité de chacune d'elles vis-à-vis de l'INH suivant le procédé utilisé pour la souche globale dont elles dérivent.

Nous ne donnerons que deux exemples des résultats obtenus, étant entendu que les autres résultats leur sont absolument comparables (V. tableau I).

TABLEAU I.

| souche globale | colonie née de cellule isolée | pousse en présence de ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) | ne pousse plus en présence de ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) |
|------------------|-------------------------------|---|---|
| 628 (R20/S30) | 628 - 1 | 0,01 | 0,02 |
| | 628 - 2 | 0,01 | 0,02 |
| | 628 - 3 | 1 | 2 |
| | 628 - 4 | 0,01 | 0,02 |
| | 628 - 5 | 5 | 10 |
| | 628 - 6 | 0,02 | 0,05 |
| | 628 - 7 | 5 | 10 |
| | 628 - 8 | 2 | 5 |
| | 628 - 9 | 5 | 10 |
| 576 (R50/S60) | 576 - 1 | 50 | 60 |
| | 576 - 2 | 10 | 20 |
| | 576 - 3 | 10 | 20 |
| | 576 - 4 | 50 | 60 |
| | 576 - 5 | 50 | 60 |
| | 576 - 6 | 50 | 60 |
| | 576 - 7 | 20 | 30 |
| | 576 - 8 | 50 | 60 |
| | 576 - 9 | 40 | 50 |

Ces essais prouvent, sans aucun doute possible, qu'il existe dans une culture globale, résistante à un taux X d'INH, des éléments bactériens dont la résistance individuelle est nettement inférieure à ce taux. Exemple : la souche globale 628 est résistante à $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, sensible à $30 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; les éléments 628-1, 628-2, 628-6 sont résistants à 0,01 ou 0,02, sensibles à 0,02 ou 0,05.

Nous nous sommes évidemment assurés par ailleurs que les cellules

bactériennes constituant chacun des clones possédaient bien toutes la même sensibilité vis-à-vis de l'INH. Un passage par le séparateur de germes et un nouveau titrage permettaient d'en juger.

Les taux de sensibilité et de résistance de la souche globale correspondent toujours, en principe, au taux le plus élevé de l'un ou de plusieurs des éléments cellulaires dont elle est composée.

Cependant, dans notre expérimentation, nous n'avons pas trouvé d'éléments bactériens dans la souche globale 628 ayant la même résistance qu'elle (R. 20/S. 30). Nous pouvons cependant affirmer que de tels éléments existent : n'en existe-t-il pas de semblables dans les six autres souches étudiées et leur absence dans la souche globale 628 ne serait-elle pas, à proprement parler, une absurdité ? Nous devons simplement conclure qu'ils sont rares.

Ceci nous conduit à l'hypothèse suivante : il doit exister dans les souches globales INH-résistantes un pourcentage variable entre éléments très sensibles et éléments moins sensibles, pourcentage réglant probablement l'action pathogène pour le cobaye.

Si nous prenons des exemples extrêmes, un mélange contenant beaucoup d'éléments très sensibles et de très rares éléments peu sensibles doit se conduire, vis-à-vis du cobaye, comme une souche normale. Un autre mélange contenant une proportion inverse d'éléments très sensibles et peu sensibles doit se conduire, vis-à-vis du cobaye, comme une souche de pathogénéité diminuée.

Nous pensons pouvoir apporter la preuve expérimentale de cette hypothèse dans une prochaine note.

BIBLIOGRAPHIE

[1] HAUDUROY (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 307 ; *Experientia*, 1951, **7**, 193.
 [2] HAUDUROY (P.) et CEVEY. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 1034.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Inoculation conjonctivale au cobaye de bacilles dysentériques, par S. SZTURM-RUBINSTEN, D. PIÉCHAUD et P. THIBAULT.

Etude de 12 souches anaérobies pectinolytiques de l'intestin des poissons et des boues d'eau douce et salée, par A.-R. PRÉVOT, H. THOUVENOT et P. KAISER.

Signification et nature des porphyrines synthétisées par les bacilles tuberculeux et paratuberculeux, par M. BARIÉTY, A. GAJDOS, M. GAJDOS-TOROK et J. SIFFERLEN.

AVIS

L'A. F. E. M. (*Aide aux Veuves et Orphelins de Médecins*) est saisie chaque jour des cas sociaux du corps médical : demandes de secours, aide aux malades, demandes de placement, secours d'urgence.

Elle va créer des séjours de vacances pour orphelins de médecins. Pour tout cela, elle vous demande votre concours bienfaisant et vous en remercie à l'avance.

Ecrire : A. F. E. M. (Président, professeur Garcin ; Secrétaire général, Dr de Véricourt), 60, boulevard de Latour-Maubourg, Paris. C. C. P. : 8162-82.

LIVRES REÇUS

H. G. Bray et K. White. — *Kinetics and thermodynamics in biochemistry*. 1 vol., 343 p., 71 fig., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1957. Prix : 42 shillings.

La cinétique et la thermodynamique des phénomènes biochimiques font l'objet d'études de plus en plus nombreuses, et il était nécessaire de réunir en un volume les principales acquisitions de ces dernières années dans ce domaine. L'ouvrage suppose chez le lecteur des connaissances relativement étendues en biochimie et en mathématiques, bien que la partie mathématique ait été réduite autant que faire se pouvait. Chacun des neuf chapitres du livre est accompagné d'une courte bibliographie, qui permettra au lecteur de se reporter aux sources.

H. T.

M. Aron et P. Grassé. — *Précis de biologie animale*, 5^e édit., 1 vol., 1 414 p., 770 fig., 2 pl. en couleurs. Masson, édit., Paris, 1957. Prix : broché (2 vol.), 5 300 fr. ; cartonné toile (1 vol.), 5 900 fr.

Il n'est plus utile de présenter le *Précis de Biologie animale* de Aron et Grassé. C'est un des ouvrages classiques des étudiants et biologistes de langue française. Ses éditions successives attestent son succès. Les profonds remaniements que les auteurs lui ont fait subir dans la 5^e édition ont permis de le mettre au courant des dernières acquisitions de la biologie. Les chapitres relatifs à la structure et à la physiologie cellulaires, aux corrélations hormonales, à la nutrition des organismes, aux relations des organismes avec leur milieu, à l'embryologie causale, à l'évolution, sont en très grande partie nouveaux. Bien qu'écrit pour les étudiants des Facultés des Sciences et des Grandes Ecoles, l'ouvrage s'adresse, en fait, à un bien plus vaste public.

H. T.

Thromboses, antibiothérapie, maladies avec auto-anticorps. XXX^e Congrès Français de Médecine, Alger, 1955. 1 vol., 283 p., 50 fig. et tableaux, Masson édit., Paris, 1957. Prix : 2 000 fr.

Comme son titre l'indique, ce Congrès a été divisé en trois parties : les maladies thrombosantes, les maladies avec auto-anticorps et la pratique de l'antibiothérapie, chacune de ces rubriques comprenant un grand nombre de communications. Une annexe rend compte de trois Symposiums techniques sur les épreuves de coagulation, les méthodes de recherche des auto-anticorps et les épreuves de sensibilité aux antibiotiques.

H. T.

I. Taylor et J. Knowelden. — *Principles of epidemiology.* 1 vol., 300 p., J. et A. Churchill édit., Londres, 1957. Prix : 30 shillings.

Le but des auteurs en écrivant le présent volume était de réunir l'essentiel de ce que l'on sait actuellement sur l'épidémiologie sous une forme à la fois simple et suffisamment étendue pour s'adresser en même temps aux étudiants et aux praticiens. Les premiers chapitres sont consacrés aux techniques de prélèvement, à la façon d'apprécier les statistiques. Puis vient l'étude de l'infection elle-même, de sa transmission, de la réaction de l'organisme à la maladie et des influences diverses que peut exercer le milieu. L'ouvrage se termine par un index bibliographique détaillé.

H. T.

Ciba Foundation Symposium on the chemistry and biology of purines. 1 vol., 327 p., J. et A. Churchill édit., Londres, 1957. Prix : 48 shillings.

D'importants progrès ont été faits au cours de ces récentes années dans la biochimie et la biosynthèse des purines. Ces nouvelles découvertes indiquent que l'activité de certains agents chimiothérapeutiques dépend de leur structure en purines. De grands progrès ont également été faits dans l'enzymologie des purines. Dans tous ces domaines, le travail de synthèse des chimistes a été prédominant, mais les communications présentées montrent la nécessité d'une coopération entre chimistes et biologistes.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.